



**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**



**ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET DE CHIMIE-PHYSIQUE**

**Institut Charles Sadron UPR22 CNRS**

**THÈSE** présentée par :

**Gwenaëlle CADO**

soutenue le : **7 Septembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **CHIMIE-PHYSIQUE**

**Étude physico-chimique,  
fonctionnalisation et applications des  
films de polysaccharides**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme BOULMEDAIS Fouzia**  
**M. FRERE Yves**

Chargée de recherche HDR, Université de Strasbourg, ICS UPR 22 CNRS, Strasbourg  
Chargé de recherche HDR, Université de Strasbourg, ICS UPR 22 CNRS, Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**M. DREAN Jean-Yves**  
**M. NARDIN Michel**

Professeur, Université de Haute Alsace, ENSISA, Mulhouse  
Directeur de recherche, Université de Haute Alsace, IS2M, Mulhouse

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. LADAM Guy**  
**M. SCHLATTER Guy**

Maître de Conférences, Université de Rouen, UFR de Sciences, Evreux  
Professeur, Université de Strasbourg, LIPHT ECPM EAc 4379, Strasbourg

*A mes parents  
A p'tit bout d' chou*

---

## Remerciements

Etape difficile que d'écrire des remerciements car il est sûr que ce seront les seules pages lues intégralement par toutes les personnes ayant le manuscrit en main. De plus, pendant ces 3 années de thèse, j'ai eu le plaisir de côtoyer de nombreuses personnes grâce à la pluridisciplinarité du sujet et j'espère n'oublier personne car chacun à sa manière, m'a permis d'avancer.

Ce travail de thèse a essentiellement été effectué dans les laboratoires de l'Institut Charles Sadron, UPR 22 CNRS, dans l'équipe "Ingénierie Macromoléculaire aux Interfaces" et à l'Unité INSERM UMR 977, « Biomatériaux et Ingénierie Tissulaire », à Strasbourg. Je tiens tout particulièrement à remercier les directeurs de ces laboratoires : Jean-François Legrand, Professeur à l'Université de Strasbourg puis Jean-Michel Guenet, Directeur de recherche au CNRS pour la direction de l'Institut Charles Sadron, et Jean-Claude Voegel, Directeur de Recherche pour la direction de l'INSERM UMR 977. Je tiens aussi à remercier les chefs d'équipe, Pierre Schaaf et Marie-Hélène Metz-Boutigue, pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs où j'ai pu effectuer ma recherche durant trois ans.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Fouzia Boulmedais et Yves Frère, Chargés de recherche au CNRS-ICS, pour m'avoir accueillie dans leur équipe et confiée cette thèse. Après des débuts difficiles et des changements de sujets, le projet de recherche qui m'avait été confié a pu être mené à bien. Merci Yves, pour la personne que vous m'avez fait découvrir durant la dernière année de la thèse, pour le soutien que vous m'avez apporté, votre grande humanité et merci de m'avoir soutenue pour participer aux conférences et école d'été. Malgré les difficultés rencontrées, merci Fouzia, pour ta disponibilité et ton efficacité, les corrections rendues en moins de temps qu'il ne faut pour l'écrire. Je ne sais

pas comment tu fais pour en faire autant. Merci à vous de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche.

Je suis très sensible à l'honneur que me font :

Jean-Yves Dréan, Professeur à l'Université de Haute Alsace à Mulhouse

Michel Nardin, Directeur de recherche à l'Université de Haute Alsace à Mulhouse

Guy Ladam, Maître de Conférences à l'Université de Rouen à Evreux

Guy Schlatter, Professeur à l'Université de Strasbourg,

d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Je leur adresse mes sincères remerciements.

Je remercie également le CNRS et la Région Alsace pour avoir financé cette thèse, notamment Messieurs Robin et Guyot.

Un très grand merci à Loïc Jierry, Maître de Conférence à l'Université de Strasbourg (ICS, CNRS-UPR 22), toujours présent quand il le faut. Merci pour tes bons conseils, ton oreille attentive, ta capacité à dédramatiser les situations et ta grande disponibilité alors même que tu es surchargé de travail.

Merci à Christophe Contal, ITA à ICS CNRS UPR 22, pour sa formation à l'utilisation de l'AFM, les nombreuses images faites notamment en liquide et avec le puissant nouveau mode PeakForce® arrivé en fin de thèse.

Merci à Joseph Hemmerlé (IR) et Karim Benmlih (technicien) de l'INSERM UMR 977 et Mathias Lefort de l'ICS pour la construction du pulvérisateur automatique et du software.

A tous les membres, anciens et nouveaux, de l'équipe IMI, aux « locataires » des bureaux voisins, Gauthier, Audrey, Manu, Caro, Adeline, Akkiz, Camille, Nathalie, César,

Lydie, Johan, Alex, Nicole, Eric (je suis sûre que j'en oublie), merci pour les discussions aux détours d'une manip et le temps passé en votre compagnie.

Merci à tous les membres de l'institut Charles Sadron, toutes les personnes croisées dans les couloirs, au café, dans les laboratoires ou à l'administration et à l'accueil sans qui ces trois années n'auraient pas été aussi riches.

Un grand merci à toute l'équipe de l'Inserm U977 pour son accueil chaleureux et leur bienveillance. Merci à toi, Rizwan (doctorant), pour tout le travail fourni, les nombreux tests antimicrobiens que tu as faits et qui restent à faire pour cet article en collaboration. Merci Roxane Fabre (Ingénieur d'étude) pour le temps accordé à mon sujet et les images de microscopie confocale, ton implication active particulièrement durant les six derniers mois de ma thèse. Merci Christian (ITA) de m'avoir permis de monopoliser ton ordinateur lors de mes semaines « culture cellulaire ».

Manu, merci pour ton aide aussi bien pour tes avis scientifiques avisés que pour me remonter le moral notamment pendant ces 3 jours de folie à Nantes avec Caro. Vous m'avez lâchement abandonnée avant la fin ;) . Ils me manquent les mots fléchés du midi.

Je pense aussi à toi Gauthier...Comment pourrais-je t'oublier...Voisin de bureau, partenaire de galère, tu as, je pense, mieux géré que moi ces trois années, même s'il vaut mieux que je ne me compare pas à toi. Merci pour tous les moments de fou rire (je n'oublie pas ton pantalon) et les sourires que tu as su me tirer quand ça n'allait pas forcément fort. Une bouée de sauvetage en quelque sorte.

Armelle, Géraldine, une énorme pensée pour vous et un grand merci. Merci Armelle pour cette formation en culture cellulaire. Merci pour les longues discussions dans le bureau et autour des images de microscopie à fluorescence. Vous avez été très pédagogues,

supporté toutes mes questions de novice et vous avez toujours été là pour aider et me permettre de m'en sortir ou même me faire des manips si besoin pour m'éviter un déplacement pendant les derniers mois.

A toi Audrey, un grand merci pour tout ce que tu m'as appris, toutes les expériences que tu m'as montrées, ta pédagogie, ta bonne humeur, ta disponibilité et j'en oublie. Mais cela ne s'arrête pas là... Tu as été ma partenaire des bas fonds, ma « stab », exercice de remontée assistée parfait, en tout cas pour moi, tu mérites le niveau 2. Tout est toujours plus facile après avoir discuté avec toi. Fais-moi penser à te demander tes tarifs pour la psychanalyse.

Merci à tous les membres du SUP pour m'avoir permis de me changer les idées, m'avoir soutenue et encouragée.

Merci à toutes les personnes croisées qui se reconnaîtront sûrement, qui m'ont aidée, encouragée, sans forcément s'en rendre compte par une attention, une parole, un geste, merci à eux.

Je terminerai enfin en remerciant mes parents et ma famille : mes sœurs qui m'ont embêtée tout le temps et m'ont changé les idées, mes frères qui, même si je ne les vois pas si souvent, me soutenaient et surtout mes parents, toujours présents et toujours là pour m'écouter s'il le fallait. Merci pour ces quelques techniques de « méditation » pour essayer d'améliorer les choses.

Et Mathias. Cela prendrait beaucoup de temps d'énumérer tout ce en quoi tu m'as aidé et je ne veux pas que tes chevilles enflent. Tu m'as toujours encouragée, soutenue et supportée dans tous les sens du terme. Tu as été présent à chaque étape de cette thèse et

m'as aidée de toutes les manières imaginables même quand je pensais que cela n'était pas possible. C'est en grande partie grâce à toi si j'en suis là. Merci pour tout.

---

## Sommaire

Remerciements .....	- 1 -
Sommaire .....	- 6 -
Abréviations et symboles .....	- 10 -
Introduction générale.....	- 14 -
Chapitre I   Revue bibliographique .....	- 18 -
1.   Complexes de polyélectrolytes.....	- 18 -
1.1.   Les polyélectrolytes .....	- 18 -
1.2.   Constante de complexation .....	- 20 -
1.3.   Application des complexes de polyélectrolytes dans le domaine biomédical ..	- 21 -
2.   Films multicouches de polyélectrolytes.....	- 22 -
2.1.   Historique des films multicouches.....	- 22 -
2.2.   Propriétés physico-chimiques des multicouches de polyélectrolytes.....	- 24 -
2.3.   Différents procédés de construction des multicouches de polyélectrolytes ....	- 36 -
2.4.   Complexes de polyélectrolytes : solution versus films multicouches .....	- 41 -
3.   Films de polyélectrolytes obtenus par pulvérisation : de l'étape par étape au simultané	
.....	- 45 -
3.1.   Construction de multicouches par pulvérisation alternée de polycations et de	
polyanions : historique.....	- 45 -
3.2.   Applications des films obtenus par pulvérisation alternée .....	- 47 -
3.3.   Construction de films par pulvérisation simultanée.....	- 51 -
4.   Applications des films multicouches dans le domaine des biomatériaux.....	- 52 -
4.1.   Biomatériaux.....	- 52 -
4.2.   Adhésion cellulaire sur les films multicouches .....	- 54 -
4.3.   Insertion de molécules actives dans un film.....	- 56 -



---

4.4. Propriétés antibactériennes des films multicouches.....	- 61 -
Chapitre II Matériels et Méthodes.....	- 64 -
1. Matériels .....	- 64 -
1.1. Les polysaccharides.....	- 64 -
1.2. Peptides.....	- 67 -
2. Préparations des films .....	- 68 -
2.1. Les substrats utilisés .....	- 68 -
2.2. Préparation des substrats .....	- 68 -
2.3. Procédé de construction des films par pulvérisation alternée ou simultanée automatique.....	- 69 -
2.4. Préparation des complexes.....	- 71 -
3. Synthèses chimiques.....	- 71 -
3.1. Synthétiseur de peptide.....	- 71 -
3.2. Fonctionnalisation de l'acide hyaluronique.....	- 72 -
4. Méthodes de caractérisation et d'analyse physique .....	- 76 -
4.1. Ellipsométrie .....	- 76 -
4.2. Microscopie à force atomique .....	- 78 -
4.3. Microbalance à cristal de quartz.....	- 81 -
4.4. Diffusion dynamique de la lumière.....	- 84 -
4.5. Microscopie à fluorescence .....	- 85 -
5. Méthodes de caractérisation et d'analyse chimique.....	- 86 -
5.1. Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire.....	- 86 -
5.2. Chromatographie Liquide Haute Performance.....	- 87 -
5.3. Séquenceur .....	- 88 -
6. Méthodes biologiques .....	- 89 -
6.1. Culture des fibroblastes gingivaux humains .....	- 89 -
6.2. Test de viabilité à AlamarBlue™ : Elisa.....	- 91 -
6.3. Marquages immunofluorescents.....	- 92 -
6.4. Marquage des récepteurs membranaires CD44.....	- 93 -

---

6.5. Observation au microscope .....	- 94 -
Chapitre III Étude des complexes chitosane/acide hyaluronique .....	- 95 -
1. Introduction .....	- 95 -
2. Influence des paramètres de préparation des complexes .....	- 97 -
2.1. Solutions de polysaccharides et préparation des complexes.....	- 97 -
2.2. Temps d'agitation .....	- 97 -
2.3. Taux de sel et stabilité dans le temps.....	- 98 -
2.4. Purification des complexes .....	- 100 -
3. Multicouches sur complexes de chitosane/acide hyaluronique .....	- 102 -
4. Conclusion.....	- 106 -
5. Complément d'étude: Influence du pH du milieu environnant sur le cœur CHI/HA .....	- 107 -
.....	- 107 -
Chapitre IV Construction de films de polysaccharides par pulvérisation simultanée ou alternée .....	- 110 -
1. Introduction .....	- 110 -
2. Résumé de l'article.....	- 111 -
3. Article: Polysaccharide films built by simultaneous or alternated spray: a rapid way to engineer biomaterial surfaces.....	- 114 -
4. Informations supplémentaires de l'article .....	- 140 -
5. Annexes : Etude préliminaire par pulvérisation manuelle .....	- 144 -
5.1. Croissance des films de polysaccharides par pulvérisation manuelle.....	- 144 -

---

5.2. Influence du rapport de charges sur la construction des films de polysaccharides par pulvérisation manuelle .....	- 148 -
5.3. Influence du séchage sur la construction des films de polysaccharides par pulvérisation manuelle alternée .....	- 149 -
6. Conclusion.....	- 151 -
Chapitre V Fonctionnalisation de films en vue d'applications biomédicales .....	- 153 -
1. Introduction .....	- 153 -
2. Résumé du projet d'article .....	- 156 -
3. Projet d'article : Multi-targeted pathogens by biodegradable polyelectrolyte multilayer coatings based on embedded antibacterial and antifungal peptide .....	- 159 -
4. Informations supplémentaires du projet d'article .....	- 174 -
5. Conclusion.....	- 188 -
Conclusion générale et perspectives .....	- 189 -
Références.....	- 192 -
Annexes .....	- 205 -
1. Films de polysaccharides réticulés à chaque étape.....	- 205 -
2. Pulvérisation d'un système organique/inorganique .....	- 208 -
Résumé.....	- 211 -

## Abréviations et symboles

AFM : Atomic Force Microscopy : microscopie à force atomique

ALG : Alginate

AMPs : Antimicrobial Peptides; peptides antimicrobiens

BP : Bleu de Prusse

BSA : Bovin Serum Albumin : Albumine de Sérum Bovin

Cd :  $\beta$ -cyclodextrine

CHI : Chitosane

CPE : Complexes de polyélectrolytes

CS : Chondroïtine sulfate

DEX : Dextran

DLS : Dynamic Light Scattering : Diffusion Dynamique de la Lumière

DMEM : Duplecco's Modified Eagle's Medium, milieu de culture cellulaire

DMMP : M-diméthylméthylphosphonate

EDC : Carbodiimide (diméthylaminopropyl) éthylique

EDTA : acide Ethylène Diamine Tetra-Acétique

EDX : Energy Dispersive X spectrométrie: Analyse Dispersive en Energie X

Fc : Ferrocène

FDP : Fluorescéine diphosphate

FGH : Fibroblastes gingivaux humain

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

FRAP : Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment

HA : Acide hyaluronique

HEP : Héparine

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl) pipérazine éthane sulfonique

HPLC : High Performance Liquid Chromatography : Chromatographie Liquide Haute  
Performance

HSA : Human Serum Albumin : Albumine de Sérum Humain

LB : Langmuir-Blodgett

LbL : Layer-by-Layer : Couche-par-Couche

Mal : maléimide

MEM : Minimum Essential Medium

MIC : Minimal Inhibitory Concentration : Concentration Minimale Inhibitrice

MPE : multicouche de polyélectrolytes

NHS : N-hydroxysuccinimide

NMVA : *N*-méthyl-*N*-vinylacétamide

PA<sup>TR</sup> : protéine A modifiée au Texas Red

PAA : poly(acide acrylique)

PAAm : polyacrylamide

PAH : poly(chlorure d'allylamine)

PAMAM : poly(amidoamine)

PAMs : peptides antimicrobiens

PBS : Phosphate Buffered Saline : Tampon Salin Phosphaté

PDADMA : poly(chlorure de diméthylallylammonium)

PdI : Indice de polydispersité

PDMS : polydiméthylsiloxane

PEG : poly(éthylène glycol)

PEI : poly(éthylène imine)

PFA : paraformaldéhyde

PGA : poly(acide-L-glutamique)

pHPMA : poly(N-hydroxy-propylméthacrylamide)

PLL : poly(L-lysine)

pNIPAM-co-MAA : poly(N-isopropylacrylamide-co-acide méthacrylique)

POPC : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine

POPG : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidyl-DL-glycérol

PS : pénicilline-streptomycine

PSM : poste de sécurité microbiologique

PSS : poly(styrène sulfonate de sodium)

PTFE : polytétrafluoroéthylène

Rho : rhodamine

RMN : résonance magnétique nucléaire

Rpm : round per minutes : tours par minute

SAXS : diffusion de rayons X aux petits angles

SSLbL : spin-spray layer-by-layer : SSLbL

SVF : sérum de veau foetal

TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine

TiNT : nanotubes de titanate

XPS : Spectroscopie de Photoélectrons induits par rayons X

## Introduction générale

Selon la définition retenue par la Conférence de la Société Européenne des Biomatériaux à Chester en 1986, « les biomatériaux sont des matériaux non vivants, utilisés dans un appareil médical, et conçus pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'ils participent à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle». Depuis les dispositifs médicaux à usage unique jusqu'aux prothèses implantées à demeure, une grande variété de produits impliquent l'utilisation de biomatériaux dans les traitements chirurgicaux de traumatismes, des maladies cardiovasculaires, ophtalmiques, urologiques ou articulaires ou encore les traitements de tumeurs cancéreuses. Le marché mondial de la thérapie cellulaire et tissulaire était estimé à 145 millions de dollars en 2005 et devrait croître à un rythme de 28% par an pour atteindre 2,1 milliards de dollars en 2015 (Jain 2006). L'un des principaux problèmes rencontrés lors de l'implantation des biomatériaux est leur intégration au sein de l'organisme et la réponse biologique de ce dernier. Il est important de contrôler l'adhésion protéique et l'adhésion cellulaire afin de pallier aux évènements néfastes tels que des réactions inflammatoires chroniques, les réactions allergiques, les infections bactériennes, ou encore les thromboses dans le cas des implants vasculaires. De nombreuses recherches sont réalisées entre autres afin d'empêcher le développement d'infections qui menaceraient la vie du patient et nécessiteraient alors le retrait du biomatériau. Les infections nosocomiales sont des infections contractées au cours d'une hospitalisation. Absentes lors de l'admission du patient, elles se développent au cours des 48 premières heures à l'hôpital. En France, 5% des



patients hospitalisés développent une infection nosocomiale (Institut de veille sanitaire 2006).

Les matériaux interagissent avec leur environnement via leurs surfaces. Ces interactions sont conditionnées par les propriétés physico-chimiques et biologiques de leurs surfaces. Il est donc nécessaire de contrôler l'ensemble de ces propriétés par le dépôt de revêtements. Différentes techniques ont été développées pour permettre le dépôt de revêtements organiques ou inorganiques sur des surfaces. Une des plus étudiée durant ces dernières années est le dépôt couche par couche. Introduite par le professeur Decher en 1991, cette méthode basée sur l'adsorption de polycations et de polyanions, permet de recouvrir de manière contrôlée pratiquement tout type de support. Historiquement, le substrat était trempé alternativement dans des solutions de polycations et de polyanions séparé par des étapes de rinçage. Le temps requis par ce procédé étant assez long, de nouvelles techniques de dépôt ont été développées, notamment le dépôt par pulvérisation, alternée ou simultanée. Cette méthode de dépôt permet un gain de temps substantiel par rapport à la méthode de trempage.

C'est dans le domaine des biomatériaux que s'inscrit ce travail de thèse qui porte sur la caractérisation physico-chimique, la fonctionnalisation et l'application des films de polysaccharides. Les polysaccharides sont des polyélectrolytes naturels biodégradables et biocompatibles, largement utilisés dans le domaine biomédical en particulier sous forme de membranes ou de particules. Le recouvrement de biomatériaux par des films de polysaccharides se révèle ainsi très intéressant. Nous avons orienté notre étude vers des films constitués de différents polysaccharides tels que le chitosane (CHI), l'acide hyaluronique (HA), l'alginate (ALG) et la chondroïtine sulfate (CS). Dans le but de développer

de nouveaux types de particules à libération cyclique (ultradienne), nous nous sommes intéressés à la construction de films multicouches sur un cœur de complexes de polysaccharides. Les difficultés de ce premier travail nous ont orientés vers l'étude de la construction et la caractérisation physico-chimique des films de polysaccharides sur des surfaces. En collaboration avec Marie-Hélène Metz-Boutigue de l'INSERM UMR 977, nous avons également abordé la fonctionnalisation de ces films par un peptide antibactérien et antifongique. Le dépôt de ce type de film biodégradable et biocompatible à la surface de biomatériaux permet de limiter à la fois les infections bactériennes et fongiques.

Après une revue bibliographique essentiellement consacrée aux multicouches de polyélectrolytes ainsi qu'à leurs applications (Chapitre I) et une description des matériels et méthodes utilisés (Chapitre II), mon travail s'articule en trois volets principaux :

- Dans le Chapitre III, il s'agissait d'étudier les complexes de CHI/HA ainsi que l'influence de différents paramètres (temps d'agitation, concentration en sel). Les multicouches à base de CHI et HA ont été construits sur ces complexes servant de cœur. Cependant, la construction de ces particules n'a pas été effective.
- Dans le Chapitre IV, nous avons étudié la construction de films de polysaccharides par pulvérisation alternée et simultanée sur des substrats. L'influence du rapport molaire de charge sur la construction ou la topographie des films a été étudiée. Une corrélation entre la complexation des polysaccharides en solution et la construction des films à base des mêmes polysaccharides par pulvérisation simultanée a été mise en évidence. Dans l'optique de leurs applications dans le domaine des biomatériaux, nous nous sommes également intéressés à la biocompatibilité de ces films vis-à-vis de cellules fibroblastes gingivales humains.

- Enfin dans le dernier chapitre (Chapitre V), les films CHI/HA ont été fonctionnalisés par greffage d'un peptide antibactérien et antifongique sur HA. L'activité de ces revêtements a été étudiée vis-à-vis de différents pathogènes (deux bactéries et une levure) et leur biocompatibilité testée vis-à-vis des fibroblastes. Ce type de films antibactériens et antifongiques peut être déposé sur les cathéters afin de limiter les infections microbiologiques.

Dans la conclusion générale, nous donnons les perspectives de ce travail, en particulier, sur la fonctionnalisation et les applications dans le domaine biomédical.

---

## Chapitre I Revue bibliographique

Depuis la fin des années 1970, l'étude des polyélectrolytes a permis de comprendre les grandes règles de formation des complexes et de construction des multicouches à base de polyélectrolytes. Nous verrons dans ce chapitre l'évolution de ces connaissances, en particulier l'utilisation de ces polymères chargés pour la formation de complexes et l'élaboration de multicouches par trempage ou pulvérisation. Enfin, nous nous intéresserons à la comparaison complexes et films de polyélectrolytes et à leurs applications potentielles dans le domaine des biomatériaux.

### *1. Complexes de polyélectrolytes*

Les complexes de polyélectrolytes (CPE) sont formés à partir du mélange de solutions de polyanion et de polycation. Ils peuvent se présenter sous forme de complexes solubles (Tsuchida and Abe 1982; Kabanov 1994a; Kabanov 1994b), de coacervats liquides (Burke *et al.* 2007) ou de précipités solides (Michaels and Miekka 1961). Dans cette première partie, nous nous intéresserons aux complexes solubles et aux coacervats liquides.

#### *1.1. Les polyélectrolytes*

Les polyélectrolytes sont des polymères dont le motif répétitif est chargé électrostatiquement. Ils peuvent être synthétiques tels que le poly(chlorure d'allylamine) (PAH) ou le poly(styrène sulfonate de sodium) (PSS) ou naturels comme les polysaccharides ou encore l'ADN. Ces polyélectrolytes sont soit forts, les groupements acide ou basique portés par les motifs sont toujours dissociés quel que soit le pH ; soit faibles, la densité de charge des polyions dépend alors du pH et résulte de la dissociation des groupements acido-

---

basiques par protonation ou déprotonation. Pour ces derniers, une constante d'acidité ( $pK_a$ ) est associée. Un polyélectrolyte faible possède un  $pK_a$  compris entre 1 et 14, sa densité de charge dépend du pH. Cependant, il existe une différence entre la constante d'acidité du polymère et celle du monomère : le  $pK_a$  de l'acide acrylique est de 4,35 alors que le  $pK_a$  de l'acide polyacrylique est de 4,75 (Dippy *et al.* 1959). Il existe ainsi une distribution de  $pK_a$  pour les polyélectrolytes due à un phénomène d'ionisation locale sur chaque monomère induit par les monomères voisins lors du repliement de la chaîne de polyélectrolyte (Manning 1978). Il existe également une autre catégorie de polyélectrolytes : les ampholytes. Ceux-ci possèdent à la fois des charges négatives et des charges positives le long de leur chaîne. Les charges portées par les chaînes de polyélectrolytes sont plus ou moins écrantées en solution par les contre-ions. Il est possible de modifier cet écrantage par ajustement de la force ionique ou du type de sel (Siegel and Firestone 1988; Antipov *et al.* 2003). Ces paramètres modifient la longueur de Debye (De Gennes *et al.* 1976; Manning 1978; Dobrynin *et al.* 1995; Tadmor *et al.* 2002). Lorsque l'écrantage dû aux contre-ions des charges portées par les chaînes de polyélectrolytes est important, les chaînes de polyélectrolytes tendent à adopter une conformation en boucle. Ceci est permis par la faible répulsion électrostatique intra-chaîne (De Gennes *et al.* 1976; Shiratori and Rubner 2000). Lorsque l'écrantage est faible, les polyélectrolytes adoptent une conformation étirée.

Le domaine d'application des polyélectrolytes est vaste : depuis le traitement de l'eau afin d'éliminer les matières en suspension par floculation, l'extraction de pétrole comme dispersant, ou encore dans l'industrie agro-alimentaire comme épaississants (Karel and Langer 1988). Ils entrent également dans la composition des cosmétiques comme émulsifiants ou dans les bétons et ciments en tant que super-plastifiants (Lewis *et al.* 2000). Ils apparaissent aussi dans le domaine de la microfluidique pour contrôler au mieux le

---

diamètre des microcanaux (Barker *et al.* 2000). De nouvelles applications se développent également dans le domaine des biomatériaux pour permettre une meilleure bio-intégration des implants chirurgicaux : des polyélectrolytes biocompatibles sont utilisés pour les recouvrir (Pruitt *et al.* 2008) même si ces revêtements sont actuellement encore en développement.

### 1.2. Constante de complexation

Les complexes de polyélectrolytes (CPE, PECs en anglais pour PolyElectrolyte Complexes) se forment par mélange de solutions de polyanion et de polycation. Une expulsion des contre-ions des chaînes de polyélectrolytes et des molécules d'eau se produit (Bucur *et al.* 2006; Sukhishvili *et al.* 2006; von Klitzing 2006; Schlenoff *et al.* 2008). Lors de cette expulsion, l'entropie augmente, ce qui favorise le rapprochement des chaînes de polyélectrolytes de charges opposées. Lorsque les chaînes sont suffisamment proches les uns des autres, de l'ordre de la longueur de Debye, la cohésion des complexes est assurée par les forces électrostatiques entre les polyélectrolytes de charges opposées. En solution aqueuse, la force motrice de la complexation est l'augmentation d'entropie. Pour évaluer l'importance de l'entropie dans la complexation, il est possible d'effectuer des mesures de microcalorimétrie. En 2006, Laugel *et al.* ont montré que la complexation de certains couples de polyélectrolytes est un phénomène endothermique : le seul facteur favorisant la formation des complexes dans ce cas est l'augmentation de l'entropie due à la libération des contre-ions et des molécules d'eau solvatant les chaînes de polyélectrolytes, comme le système poly-L-lysine/poly(acide-L-glutamique) (PLL/PGA) ou PLL/acide hyaluronique (HA) à pH 7,4. Les interactions entre les chaînes sont alors faibles. Pour d'autres couples, la réaction est exothermique : l'enthalpie de complexation est négative. L'entropie et l'enthalpie de la

---

réaction sont alors favorables à la complexation. Dans ce dernier cas, les interactions entre polycations et polyanions sont fortes. C'est en particulier le cas du système PAH/PSS à pH 7,4 (Laugel *et al.* 2006).

Différents paramètres influencent la complexation et les propriétés des CPE : la structure des polyélectrolytes, leur masse molaire, la longueur de chaîne, leur densité de charge, leur concentration, la température ainsi que le pH ou la force ionique qui contrôlent les densités de charge...(Tsuchida and Abe 1982; Philipp *et al.* 1989; Kabanov 1994a; Thunemann *et al.* 2004; Hubbe *et al.* 2005; Sukhishvili *et al.* 2006). Par exemple, en l'absence de sel, la complexation entre deux polyélectrolytes de charges opposées ainsi que l'adsorption d'un polyélectrolyte sur une surface de charge opposée est un phénomène irréversible car un très grand nombre de liaisons électrostatiques est mis en jeu. Pour détruire le complexe ou désorber la chaîne de polyélectrolyte, il faudrait que toutes les liaisons électrostatiques se rompent simultanément, ce qui est très peu probable (Sukhishvili *et al.* 2006). A une concentration en sel critique, qui dépend de chaque système, l'écrantage des charges des polyélectrolytes est suffisant pour dissocier les complexes ou désorber les chaînes de polyélectrolytes de la surface. Ceci est dû à la diminution de la densité de charges effectives portées par les chaînes.

### *1.3. Application des complexes de polyélectrolytes dans le domaine biomédical*

L'intérêt porté aux CPE est de plus en plus important, notamment grâce aux applications nombreuses et variées en particulier dans le domaine biomédical. Un grand nombre d'études scientifiques utilisent les complexes de polyélectrolytes pour la transfection d'ADN, par exemple, des nanoparticules de chitosane et d'ADN (Erbacher *et al.*

---

1998; Duceppe and Tabrizian 2009). Les CPEs peuvent aussi permettre l'encapsulation et la libération, ciblée ou non, de médicaments comme l'insuline pour le traitement du diabète par voie orale (Damgé 1991; Berger 1993; Yin *et al.* 2009), pour le traitement de l'asthme par voie respiratoire (Oyarzun-Ampuero *et al.* 2009) ou pour des thérapies anticancéreuses afin de détruire les tumeurs de manière ciblée (Jain and Jain 2008; Choi *et al.* 2009; He *et al.* 2009).

## 2. Films multicouches de polyélectrolytes

La surface d'un matériau est le lieu privilégié des interactions entre celui-ci et son milieu environnant. Pour contrôler ces interactions, il est nécessaire de maîtriser les propriétés de cette interface. Il s'agit d'un aspect crucial dans le domaine des biomatériaux où la maîtrise des interactions cellule-matériau est recherchée. Ceci est rendu possible par le dépôt de films minces dont les propriétés de surface sont contrôlées. Les multicouches de polyélectrolytes, grâce à leur facilité de mise en œuvre ainsi que la vaste gamme de composés disponibles, constituent une méthode appropriée de fonctionnalisation des biomatériaux par modification de leur surface. A travers ce chapitre, nous ferons le point sur l'état actuel des connaissances dans ce domaine.

### 2.1. Historique des films multicouches

Deux types de revêtements pour les matériaux existent : l'un inorganique et l'autre organique. Pour les films organiques, c'est au début du XX<sup>ème</sup> siècle que sont obtenus des films minces nanostructurés par Langmuir et Blodgett, communément appelés films de « Langmuir-Blodgett » (LB). Ces films sont constitués d'une monocouche de molécules tensioactives ou amphiphiles transférée de l'interface air/eau d'une cuve de solution sur le



substrat par trempage (Blodgett 1934; Blodgett and Langmuir 1937) (Figure 1). L'adsorption du film est basée sur des interactions de type hydrophile/hydrophobe avec le substrat. Une deuxième immersion conduit à l'adsorption d'une seconde couche. La méthode peut être répétée plusieurs fois en faisant varier les espèces à chaque étape de dépôt. L'épaisseur de ces films varie de quelques Angströms à plusieurs nanomètres. La méthode LB est principalement utilisée dans l'étude des bicouches lipidiques, mimant la paroi cellulaire.

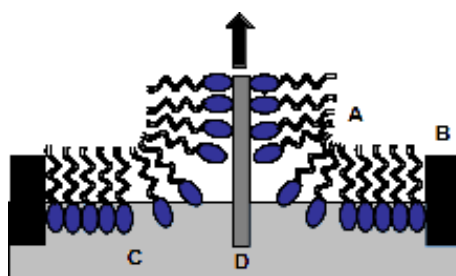


Figure 1 : Méthode de Langmuir-Blodgett : adsorption d'une monocouche lipidique sur une surface solide par passage du substrat au travers d'une monocouche lipidique créée à une interface air-eau. A : molécules, B barrière, C cuve, D substrat.

Cette méthode présente cependant de nombreux inconvénients tels que l'instabilité des films, une limitation liée à la forme du substrat ainsi que la présence de réactions parasites non contrôlées entre le solvant et les molécules contenues dans le film. Non seulement les composés déposés se limitent à des tensioactifs ou des amphiphiles mais, au bout de quelques couches déposées, la désorption devient plus favorable que l'adsorption d'un point de vue énergétique, conduisant à des films à de faible épaisseur.

Une autre méthode d'élaboration de films multicouches a été proposée dès 1966 par Iler (Iler 1966). Elle repose sur les interactions électrostatiques entre particules colloïdales anioniques et cationiques pour la construction de films multicouches. Plus tard en 1980, Fromherz est le premier à mentionner l'application de ce concept à l'adsorption de protéines et de polyélectrolytes de charges opposées. Il mentionne également que chaque dépôt doit s'accompagner d'un changement de signe de la charge de surface, interprété aujourd'hui

---

par une surcompensation de charge. Fromherz n'a cependant pas apporté la preuve de la construction de tels films (Fromherz 1980; Gölander *et al.* 1982).

Dans les années 1980, d'autres méthodes d'auto-assemblage ont été développées pour former des films organiques structurés, à base de chimie de coordination des systèmes métal/phosphonate (Cao *et al.* 1992) et de chimie covalente (Netzer and Sagiv 1983). La première consiste en l'auto-assemblage de molécules, composées d'une tête phosphonate et d'une queue carbonée hydrophobe, par fixation des têtes phosphonate sur un substrat métallique par chimie de coordination et par interaction hydrophobe. Ces procédés sont cependant limités à un certain nombre de systèmes chimiques et ne permettent pas d'obtenir de manière reproductible des films homogènes.

Ce n'est qu'au début des années 1990, avec l'adaptation des travaux d'Iller aux polyélectrolytes, que les travaux de Decher ont véritablement exploité les capacités de la méthode d'assemblage couche par couche (Decher and Hong 1991; Decher and Schmitt 1992; Decher 1997). La technique "couche par couche" (LbL, layer-by-layer) appliquée aux polyélectrolytes conduit à la formation de films appelés multicouches de polyélectrolytes (MPE ou PEMs en anglais pour polyelectrolyte multilayers). Cette technique est basée sur l'adsorption alternée de polycations et de polyanions, chaque étape de dépôt étant suivie d'une étape de rinçage avec une solution tampon ou de l'eau.

## *2.2. Propriétés physico-chimiques des multicouches de polyélectrolytes*

Au cours de la construction, la masse déposée et l'épaisseur de la multicouche augmentent avec le nombre d'étapes de dépôt. Les premiers films étudiés suivaient une croissance linéaire de la masse du film avec le nombre de dépôts effectués. Plus tard, il a été montré qu'il existait deux modes de croissance des multicouches de polyélectrolytes : la

---

croissance est ainsi linéaire ou exponentielle selon le type de polyélectrolytes utilisé, le pH, la force ionique ou la température.

### 2.2.1. Le modèle des trois zones

Pour permettre de décrire le mécanisme de construction d'une multicouche, le modèle dit « des trois zones » a été proposé par Ladam *et al.* (Ladam *et al.* 2000). Ce modèle distingue trois zones dans le film multicouche : l'interface substrat/film (zone I), l'interface film/solution (zone III) et la zone séparant les deux précédentes (zone II). Au début de la croissance, l'épaisseur du film est très faible. La structure du film, sa densité de charge surfacique et son caractère hydrophile sont très influencés par le substrat (Castelnovo and Joanny 2000). Après plusieurs bicouches de polycations/polyanions déposées, l'influence du substrat disparaît, les propriétés du film ne dépendent plus du nombre de couches déposées faisant apparaître la zone intermédiaire du film (zone II). Cette zone représente également la majeure partie du film. La zone I, appelé « zone précurseur » et la zone III, « zone externe » subissant l'influence de la surface du film, sont composées d'une ou plusieurs couches de polyélectrolytes. Leur épaisseur est définitive après la période transitoire du début de construction, mais n'est pas connue. Elle dépend du substrat, de la structure chimique des polyélectrolytes utilisés, ainsi que des conditions d'adsorption (Figure 2).

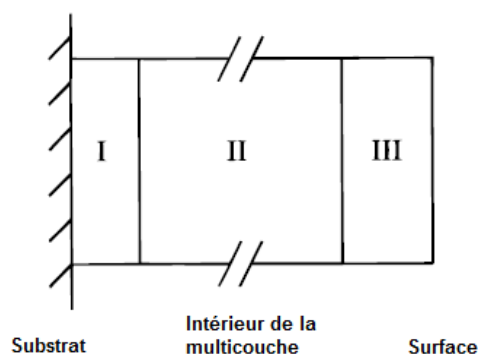


Figure 2 : Représentation du modèle dit « des trois zones » lors de la construction d'une multicouche. Zone I : partie de la multicouche subissant l'influence du substrat, Zone II : partie de la multicouche indépendante du substrat ou de l'interface avec l'environnement extérieur, Zone III : partie de la multicouche subissant l'influence de l'environnement extérieur (Ladam *et al.* 2000)

### 2.2.2. Mode de croissance

Il existe deux catégories de films multicouches (Figure 3) : les uns ayant une croissance linéaire (Decher 1997) et les autres une croissance exponentielle (Elbert *et al.* 1999; Picart *et al.* 2001; Picart *et al.* 2002). Dans le cas d'une construction linéaire, les polyélectrolytes de la solution n'interagissent qu'avec les polyélectrolytes de charge opposée de la surface externe du film (Decher 1997). Après chaque étape de dépôt, la charge de surface est inversée : il y a surcompensation de charge (Caruso *et al.* 1998; Ladam *et al.* 2000). Des mesures de diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) et de diffusion de neutron (Decher and Schmitt 1992) ont mis en évidence la structure stratifiée des films PAH/PSS par utilisation de polyélectrolytes deutérés insérés au cours de la construction. Dans le cas des films à croissance linéaire, l'interpénétration des polycations et des polyanions ne dépasse pas les couches adjacentes (Decher 1997).

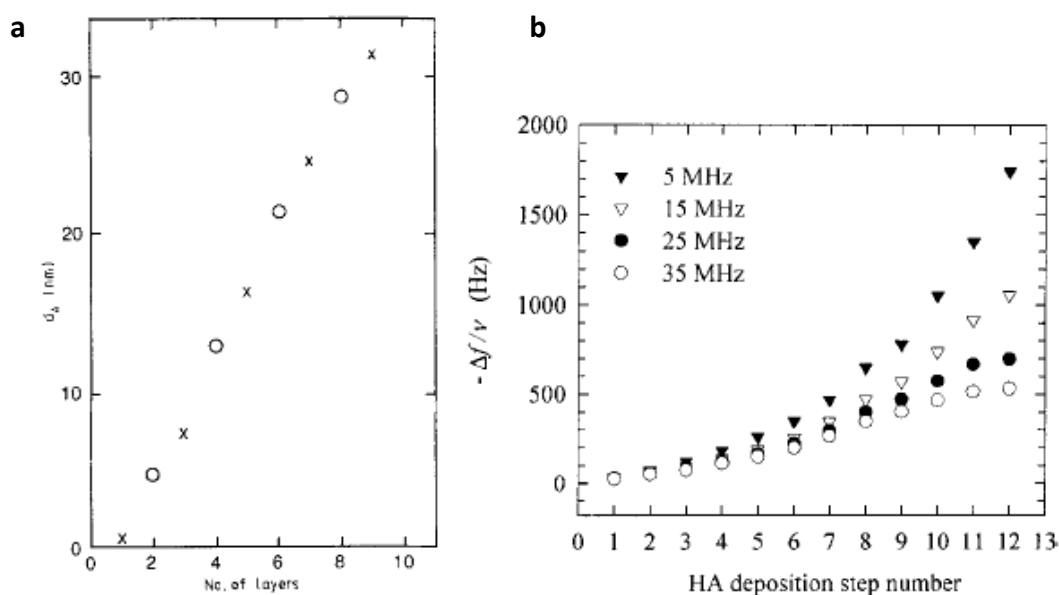


Figure 3 : Illustration des deux modes de croissance des multicouches de polyélectrolytes : (a) Croissance linéaire obtenue pour un film poly(allylamine)/poly(styrène sulfonate) (PAH/PSS) : évolution de l'épaisseur du film en fonction du nombre de dépôts mesurée par ellipsométrie, l'incrément d'épaisseur est le même à chaque étape. × PAH, ○ PSS (Ramsden *et al.* 1995). (b) Croissance exponentielle obtenue pour un film poly(L-lysine)/acide hyaluronique (PLL/HA) : évolution du changement de fréquence de résonance en fonction du nombre de dépôts mesurée par microbalance à cristal de quartz et reliée en première approximation à la masse adsorbée. L'incrément de masse est proportionnel à l'épaisseur du film à chaque étape (Picart *et al.* 2001).

Découvert à la fin des années 1990, les films à croissance exponentielle ont été mis en évidence avec l'utilisation de systèmes à base de polypeptides et de polysaccharides tels que PLL/alginate (Elbert *et al.* 1999), PLL/PGA (Lavalle *et al.* 2002) et PLL/HA (Picart *et al.* 2001). Le mécanisme de croissance exponentielle est différent de celui conduisant à une croissance linéaire (Lavalle *et al.* 2004). Il y a diffusion d'au moins un des deux polyélectrolytes dans toute l'épaisseur du film lors de sa construction (Picart *et al.* 2002). Prenons l'exemple du système PLL/HA. Il a été montré que la PLL pouvait diffuser dans et hors du film lors de chaque étape de construction. Lors du dépôt de solution de polycations (PLL) sur un film chargé négativement terminé par une couche de HA, les chaînes de polycation vont à la fois interagir avec les charges négatives en surface et diffuser à l'intérieur du film en formant un réservoir de polycations libres. Lors du rinçage par la solution tampon, une partie seulement des chaînes de polycations libres diffuse hors du film.

---

En effet, l'excès de charge positive en surface du film, due à l'adsorption de PLL crée une barrière de potentiel et empêche la diffusion de la totalité des chaînes de polycations hors du film. Par la suite, lorsque le film est mis au contact de la solution de polyanions (HA), les chaînes de HA interagissent avec l'excès de PLL en surface et inversent ainsi la charge de surface du film par surcompensation de charge. La barrière de potentiel, empêchant la diffusion hors du film de la PLL libre, disparaît. La PLL diffuse alors vers l'extérieur et complexe les polyanions en surface pour former un nouveau dépôt de matière. A cette étape, le processus se poursuit jusqu'à épuisement du réservoir. L'augmentation d'épaisseur est due à la fois à l'adsorption en surface (augmentation constante, linéaire) et à la formation des complexes polycations/polyanions qui résulte de la diffusion des polycations libres hors du film (Figure 3b). L'incrément d'épaisseur est proportionnel à l'épaisseur du film : la croissance est alors exponentielle.

Les multicouches à croissance linéaire ne permettent pas la diffusion de polyélectrolytes et de protéines. Elles peuvent donc servir de film barrière alors que ceux à croissance exponentielle peuvent servir de réservoir de principes actifs. Ces propriétés peuvent être mises à profit pour réaliser des films compartimentés par alternance de domaines à croissance linéaire et d'autres à croissance exponentielle. Ce type d'architecture a été réalisée par dépôt de film PAH/PSS sur des films PLL/HA (Garza *et al.* 2004). Des architectures à base de deux films « réservoirs » PLL/HA séparés par un film barrière PAH/PSS ou PDADMA/PSS ont été réalisés et étudiés en particulier pour créer des surfaces mécano-répondant (Mertz *et al.* 2007). La figure 4 représente une image de microscopie confocale de cette architecture en vue transversale : la PLL des films réservoirs « exponentiels » est marquée par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou la rhodamine (Rho). Les films barrières confinent la PLL marquées dans les deux films réservoirs. Par

étirement mécanique de ces assemblages, des nanopores sont créées dans la barrière et permettent la diffusion des molécules marquées d'un réservoir à l'autre (Mertz *et al.* 2007).

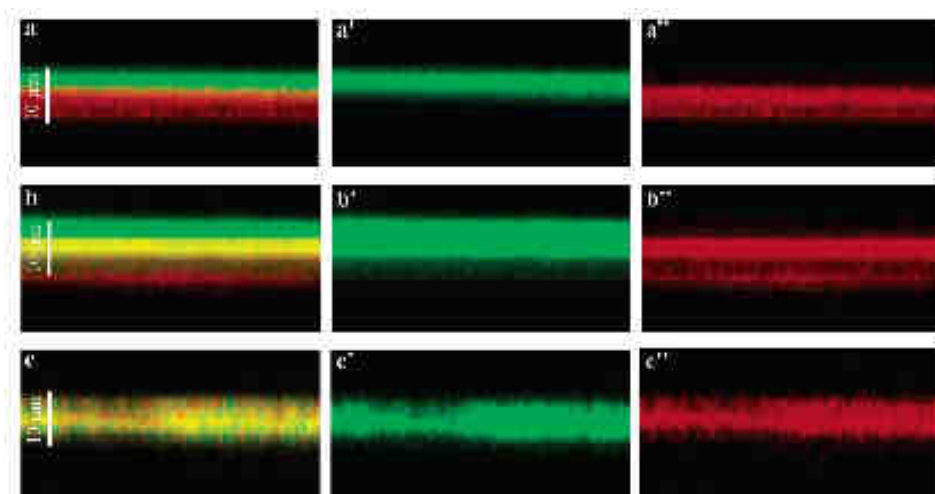


Figure 4 : Sections en z d'images de microscopie confocale en solution (Eau NaCl 0,15 M) d'un film multicouche  $(\text{PLL}/\text{HA})_{30}/\text{PLL}^{\text{Rho}}/(\text{HA}/\text{PLL})/(\text{PSS}/\text{PDADMA})_5/(\text{HA}/\text{PLL})_{30}/\text{HA}/\text{PLL}^{\text{FITC}}$  correspondant à 2 réservoirs séparés par une barrière. Les images ont été réalisées pour un taux d'étirement de 90 % après (a) 1 min, (b) 240 min et (c) 480 min. a, b et c correspondent aux sections pour le filtre rouge et vert ; a', b' et c' au filtre vert ; a'', b'' et c'' au filtre rouge. L'épaisseur totale de la multicouche est de 10  $\mu\text{m}$  environ. La taille des images est de  $55 \times 28 \mu\text{m}^2$  (Mertz *et al.* 2007).

### 2.2.3. De la croissance exponentielle à la croissance linéaire

Des travaux ont montré qu'une transition s'opérait du régime de croissance exponentielle vers une croissance linéaire après un certain nombre d'étapes de dépôt. En étudiant la croissance d'un film multicouche de PAH et d'un mélange binaire de polyanions (PGA-PSS), Hübsh *et al.* ont été les premiers à observer ce phénomène (Hübsh *et al.* 2004). Ces polyanions ont été choisis à cause de leur régime de croissance différent avec le PAH : le système PAH/PGA conduit à une croissance exponentielle des films (Boulmedais *et al.* 2003) alors que le système PAH/PSS est à croissance linéaire. Après environ 30 étapes de dépôt, une croissance linéaire du film avec le nombre de dépôts fait suite à la croissance exponentielle (Figure 5).

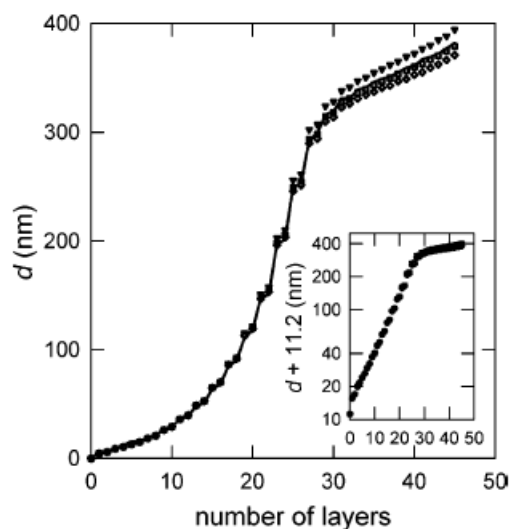


Figure 5 : Illustration de la transition de la croissance exponentielle à la croissance linéaire sur le système PAH/(mélange PSS<sub>0,5</sub> – PGA<sub>0,5</sub>) : évolution de l'épaisseur mesurée par microbalance à cristal de quartz (Hübsch *et al.* 2004).

D'autres travaux plus récents ont également décrit une transition exponentielle/linéaire pour les films PLL/HA (Porcel *et al.* 2006). Une des premières explications de cette transition est liée à l'épaisseur du film qui ne permet plus la diffusion à travers tout le film pendant un temps fini d'exposition à la solution, généralement de quelques minutes. Cependant par la suite, il a été démontré que la diffusion des polyélectrolytes dans le film est extrêmement rapide. Une autre hypothèse avancée serait que seules les premières chaînes qui diffusent à l'extérieur du film et qui atteignent l'interface film/solution produisent des complexes qui restent liés au film. Les complexes formés par la suite n'interagissent pas suffisamment pour y rester accrochés et diffusent donc vers la solution. Cette hypothèse n'est cependant pas prouvée et la question reste encore ouverte.

Dans le cas d'autres systèmes tel que PDADMA/PSS, l'évolution exponentielle de la croissance, ou l'évolution super linéaire, est reliée à la rugosité du film qui augmente avec le nombre de dépôt, accroissant ainsi la surface du film. De plus, selon des travaux de Salomäki



---

*et al.* sur ce système, la vitesse de changement de régime est d'autant plus rapide que la température de construction est faible (Salomäki *et al.* 2005) (Figure 6).

#### 2.2.4. Paramètres influençant la croissance des films multicouches

De nombreux paramètres influencent la croissance des films multicouches, leur épaisseur, leur morphologie ou leur régime de croissance.

##### 2.2.4.1 Influence de la température

L'influence de la température sur la croissance des films multicouches de polyélectrolytes a été étudiée principalement sur les films à croissance linéaire. Büscher *et al.* (Büscher *et al.* 2002) ont montré que l'épaisseur du film PAH/PSS augmente avec la température. Il en est de même pour le système PDADMA/PSS où pour un intervalle de température de construction de 10°C à 70°C, l'épaisseur augmente linéairement (Salomäki *et al.* 2005) (Figure 6). D'autre part, il a été montré que le type de croissance des films dépendait également de la température imposée lors de la construction. Pour le système PDADMA/PSS, la croissance est linéaire à 25°C et exponentielle à partir de 45°C. La raison pour laquelle la température induit une augmentation d'épaisseur du film n'a pas encore été clarifiée. Il est supposé que la température a un effet similaire à celui de la force ionique. L'augmentation de la température réduit les répulsions intrachâînes des polyélectrolytes menant à leur dépôt sous une conformation pelote d'où l'obtention d'épaisseur plus importante. L'effet de la température est plus prononcé pour le système PDADMA/PSS que pour PAH/PSS (Tan *et al.* 2003).

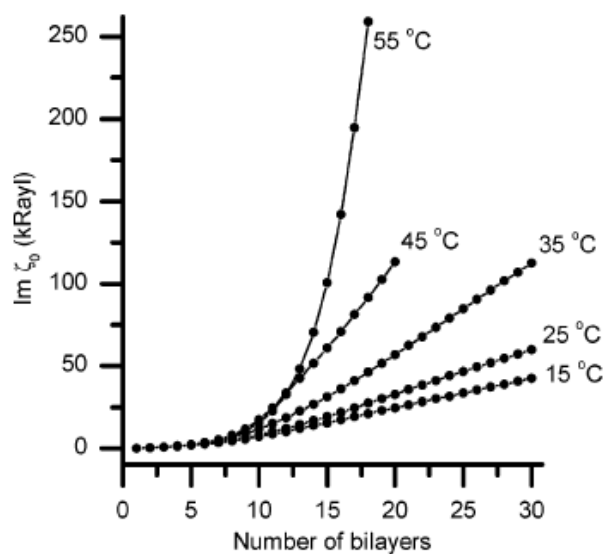


Figure 6 : Effet de la température sur le régime de croissance d'un film multicouche de PDADMA/PSS en présence de 0,1 M NaBr suivi par l'évolution de l'impédance d'un substrat de quartz plaqué d'or (Salomäki *et al.* 2005).

#### 2.2.4.2 Influence de la densité de charge des polyélectrolytes : force ionique et pH

Différents types d'interaction sont mis en jeu lors de la construction de films multicouches. Des liaisons hydrogène (Stockton and Rubner 1997; Wang *et al.* 1997; Tan *et al.* 2003), des interactions hydrophobes (Cochin and Laschewsky 1999; Kotov 1999) et des interactions électrostatiques peuvent intervenir. Le type d'interaction dépend de la nature chimique des molécules utilisées ainsi que des conditions de dépôt.

Des études ont précisément défini la nature de l'appariement des charges de polyélectrolytes au sein des multicouches (Farhat and Schlenoff 2001; Schlenoff and Dubas 2001). Dans le cas des polyélectrolytes forts, il y a quasi compensation de charge entre polyanion et polycation. Le phénomène est appelé « compensation intrinsèque des charges ». Ceci est très favorable d'un point de vue entropique grâce à l'expulsion des contre-ions du film. Lorsque les charges d'un polyélectrolyte ne sont pas totalement appariées avec celles du polyélectrolyte de charge opposée, les contre-ions compensent

---

l'excès de charge, équivalent à des charges fixes dans un milieu poreux. Cette compensation de charge est dite extrinsèque et induit l'apparition d'un potentiel de Donnan (Liu *et al.* 1997; Harris 2000; Krasemann and Tieke 2000), à l'origine des propriétés de membranes semi-perméables des films (Papp ; Krogman *et al.* 2008a).

La notion de densité de charges des polyélectrolytes est donc un paramètre très important pour le contrôle de la construction des films. Cette densité a un impact direct sur la conformation de la chaîne des polyélectrolytes qui est un équilibre entre les forces électrostatiques de répulsion et les forces élastiques. Les premières sont favorables à l'élongation des chaînes pour minimiser l'énergie d'interaction entre les monomères, les secondes leur sont opposées et maximisent l'entropie de configuration. Les contre-ions ont également un rôle essentiel dans la conformation des polyélectrolytes (Ariel and Andelman 2003). En effet, par définition, la longueur de Debye est reliée à la force ionique de la solution dans laquelle le polyélectrolyte a été dissout. Plus la force ionique est faible, moins l'écrantage dû aux contre-ions est important. Cela conduit à une longueur de Debye élevée. La chaîne polymérique adopte alors une conformation étirée. A l'inverse, à forte force ionique, la longueur de persistance de la chaîne diminue fortement, les chaînes de polymère se mettent en pelote. Les épaisseurs des films sont plus grandes pour des chaînes de polyélectrolyte en conformation pelote que lorsque les chaînes sont étirées. Ce phénomène explique l'augmentation de l'épaisseur des films avec la force ionique des solutions de polyélectrolytes. Ladam *et al.* ont établi une loi de puissance empirique pour le système PAH/PSS entre les quantités de polyélectrolytes adsorbées et la concentration en sel de la solution (Ladam *et al.* 2000).

---

Une meilleure compréhension de l'influence de la densité de charge a été permise avec l'utilisation de polyélectrolytes faibles, c'est-à-dire ceux dont la densité de charge dépend du pH. Pour un polyacide faible, les fonctions acides se déprotonnent progressivement avec le pH et la densité de charge augmente. A l'inverse les polybases faible deviennent neutres avec l'augmentation du pH. L'influence de l'écrantage et de la densité de charge sur l'épaisseur des films d'un tel type de système a été étudiée par modification du pH des solutions de polyélectrolytes (Yoo *et al.* 1998; Mendelsohn *et al.* 2000; Shiratori and Rubner 2000). Yoo *et al.* ont étudié le système PAH/PAA et ont montré qu'un film constitué de 30 bicouches de PAH (pH 2,5)/PAA (pH 4,5) présente une épaisseur de 70 nm qui augmente jusqu'à 200 nm si les deux solutions PAH et PAA sont à pH 4,5.

#### 2.2.4.3 Influence de la nature du contre-ion

La nature des contre-ions des chaînes de polyélectrolytes joue également un rôle important dans les interactions électrostatiques. Pour le système PDADMA/PSS, en conservant le sodium comme cation, Salomäki *et al.* (Salomäki *et al.* 2004) ont montré que le changement de l'anion influençait l'épaisseur de la multicouche lors de la construction. Habituellement, les ions sont choisis dans la série de Hofmeister (Hofmeister 1888; Hofmeister 1890) qui classe les ions dans l'ordre du plus cosmotrope (grande sphère de solvation) au plus chaotrope (petite sphère de solvation). L'épaisseur des films PDADMA/PSS est d'autant plus grande que l'anion est chaotrope, c'est-à-dire lorsque sa sphère de solvation est plus petite (Figure 7). Le régime de croissance des films multicouches passe de linéaire à exponentielle en passant d'un contre-ion cosmotrope à un contre-ion chaotrope.

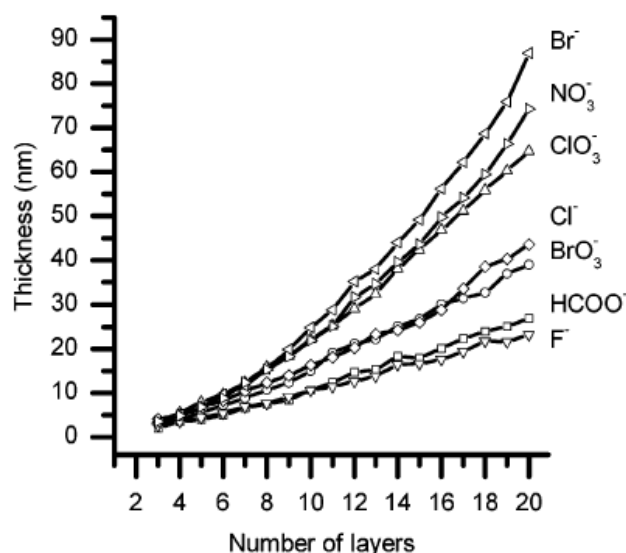


Figure 7 : Illustration de l'effet du contre ion selon la série d'Hofmeister sur des films de Poly(chlorure de diallyldiméthyle ammonium)/Poly(styrène sulfonate) PDADMA/PSS : l'épaisseur du film augmente avec la chaotropie de l'anion (Salomäki *et al.* 2004).

Un travail similaire a été effectué sur le système PAH/PSS (El Haitami *et al.* 2009) et confirme les résultats obtenus sur PDADMA/PSS concernant l'influence des contre-ions sur l'épaisseur du film. Le régime de croissance reste cependant linéaire dans le cas de PAH/PSS. De plus, ce travail a permis de corrélérer le potentiel de Donnan (les charges électrostatiques de l'intérieur du film) avec la chaotropie du contre-ion. Un potentiel de Donnan positif dans le film a été mesuré par voltampérométrie cyclique, expliqué par un excès de charges positives provenant des groupements ammonium du PAH compensés par les contre-ions. Plus le contre-ion anionique est chaotrope, plus le potentiel de Donnan est positif. Ce résultat s'explique par le fait qu'un ion chaotrope possède une petite sphère de solvation écrantant plus efficacement les charges positives du PAH. Pendant la construction du film, les chaînes de PAH s'adsorbent sous une conformation pelote, faisant apparaître des charges « fixes » positives à l'origine du potentiel de Donnan, dues à la labilité des contre-ions.

Porcel *et al.* (Porcel *et al.* 2007) ont montré que la croissance des films multicouches est également influencée par d'autres facteurs tels que la masse molaire des polyélectrolytes ou la concentration des solutions. Lors de la construction d'un film PLL 360

---

kDa/HA 400 kDa sur une multicouche PLL 360 kDa/HA 130 kDa, une diminution de la vitesse de croissance est observée. La pente de la courbe de l'épaisseur en fonction du nombre de couches diminue. L'augmentation de la masse molaire du HA rend plus difficile la diffusion de la PLL dans le film et tend à ralentir la croissance de celui-ci. De même Dubas *et al.* ont montré que la concentration des solutions influence l'épaisseur du film. Pour le système PDADMA/PSS de 5 bicouches, l'épaisseur varie de 55 nm à 71 nm pour des solutions de polymères allant de 1 mmol.L<sup>-1</sup> à 30 mmol.L<sup>-1</sup>, le temps de dépôt restant de 5 min à 600 rpm par « spin-coating » suivi de trois rinçages entre chaque couche (Dubas and Schlenoff 1999).

### *2.3. Différents procédés de construction des multicouches de polyélectrolytes*

#### *2.3.1. Principe du dépôt couche par couche*

Très développé à partir des années 1990, le dépôt couche par couche est schématisé dans la figure 8. Les dépôts successifs de polyélectrolytes se font sur un substrat, généralement chargé négativement, mis au contact d'une solution de polycation suivi d'une étape de rinçage puis d'une solution de polyanion également suivie par une étape de rinçage pendant un temps donné (de 5 à 20 min). La mise au contact de la solution de polyélectrolytes permet l'adsorption du composé en solution (Ramsden *et al.* 1995; Advincula *et al.* 1996; Hoogeveen *et al.* 1996), le surplus est éliminé par l'étape de rinçage (Caruso *et al.* 1998; Lvov *et al.* 1999). A la fin de l'étape d'adsorption et de rinçage des polycations, la surface est alors chargée positivement : il y a surcompensation de charge (Caruso *et al.* 1998; Ladam *et al.* 2000). Cette surcompensation de charge a été mise en évidence par des mesures du potentiel zêta (Hoogeveen *et al.* 1996; Caruso *et al.* 1998; Ladam *et al.* 2000). Il s'agit de la force motrice de la construction des films multicouches de

polyélectrolytes. La surface, nouvellement chargée positivement, peut ensuite être exposée à une solution de polyanions qui seront adsorbés électrostatiquement. Un nouveau rinçage permet l'élimination du surplus de polyanions. La surface est alors chargée négativement. Une paire de couches est finalement formée. Des cycles consécutifs, alternant l'adsorption de polycations et de polyanions, permettent ainsi la croissance par étapes du film multicouche.

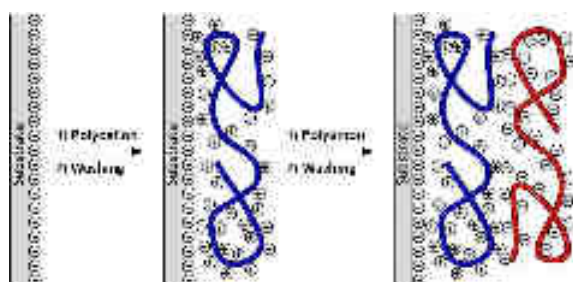


Figure 8 : Construction schématique d'une multicouche de polyélectrolytes par adsorptions successives de polycations et de polyanions (Decher and Hong 1991; Decher and Schmitt 1992; Decher 1997).

### 2.3.2. Différentes techniques de dépôt couche par couche

Il existe actuellement différentes méthodes de dépôt pour construire les multicouches de polyélectrolytes : le trempage, la centrifugation et la pulvérisation, avec pour chacune des avantages et des inconvénients.

#### 2.3.2.1 La méthode de trempage

Ce procédé a été introduit dans les années 1990 par Decher *et al.* pour construire des films PAH/PSS (Decher and Hong 1991; Decher and Schmitt 1992; Decher 1997) (Figure 9). Cette technique très simple permet de recouvrir un substrat, quelque soit sa forme. Le substrat est trempé alternativement dans une solution de polycations et de polyanions, chaque trempage étant suivi par une étape de rinçage.

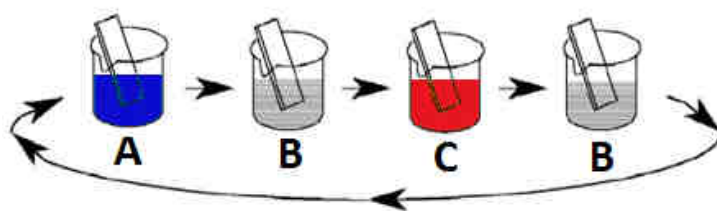


Figure 9 : Représentation de la méthode de trempage, ou « dipping ». A, la solution de polycations, B, la solution de rinçage, C, la solution de polyanions (Decher and Hong 1991).

Le temps de trempage dans les solutions de polyélectrolytes doit permettre l'adsorption des composés et est compris entre cinq et vingt minutes. En ajoutant le temps de rinçage, le temps nécessaire pour la construction d'une bicouche est situé entre vingt et quarante minutes. Cette méthode est un procédé de dépôt lent, mais qui consomme cependant peu de produit puisque la solution de polyélectrolytes peut servir pour le dépôt de plusieurs couches. Les caractéristiques des films obtenus tels que l'épaisseur et la rugosité, dépendent des paramètres de construction : temps de trempage, concentration en polyélectrolytes, force ionique, pH et température. Une méthode dérivée de celle-ci est utilisée dans certains dispositifs comme la microbalance à cristal de quartz et la spectroscopie optique à guide d'onde. Dans ces méthodes dites « de flux », les solutions sont injectées dans la cellule de mesure contenant le substrat.

### 2.3.2.2 La méthode de centrifugation

A partir des années 2000, de nouveaux procédés sont utilisés afin de réduire le temps de construction des films. Le dépôt par centrifugation (ou « spin coating ») est une technique très utilisée pour déposer des résines photorésistantes lors de l'élaboration des circuits intégrés dans l'industrie du semi-conducteur (Bakos and Rasile 1977). Lee et Hong ont été les premiers à utiliser ce procédé de centrifugation dans le domaine des multicouches de polyélectrolytes (Lee *et al.* 2001). Sous l'effet de la force centrifuge, la solution de polyélectrolytes déposée sur un substrat mis en rotation, s'étale de manière uniforme.



L'excès de solvant est alors éjecté ou évaporé. Le procédé se poursuit avec la solution de polyélectrolytes de charge opposée pour former la seconde couche et ainsi de suite (Figure 10). Aucune étape de rinçage n'est appliquée.

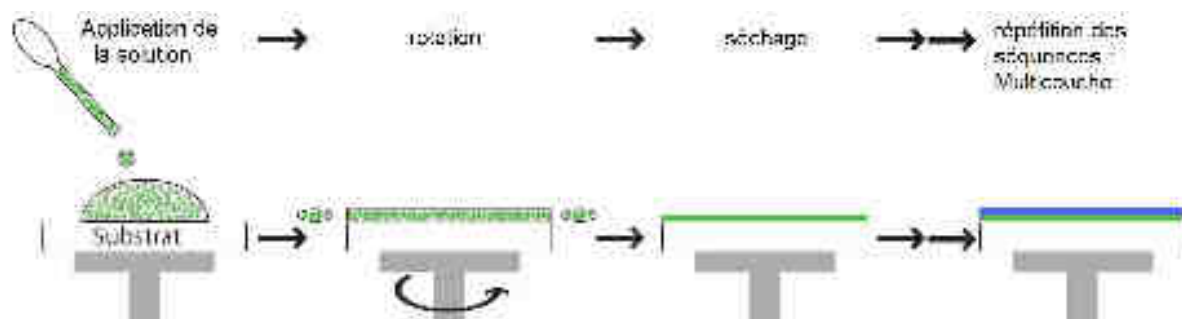


Figure 10 : Représentation du procédé de centrifugation ou « spin coating ».

Avec un dépôt par centrifugation, le temps nécessaire pour la construction d'une bicouche de polyélectrolytes n'est plus que d'environ 80 s. L'épaisseur et la rugosité des films dépendent de la vitesse de rotation, de la viscosité de la solution et de la volatilité du solvant en plus des paramètres déjà évoqués dans le cas du trempage. Cette méthode permet d'obtenir des films possédant une meilleure tenue mécanique que les films obtenus par trempage (Jiang *et al.* 2004).

### 2.3.2.3 La méthode de pulvérisation

Un autre procédé a été développé afin de construire des films : la pulvérisation ou « spray-assisted coating ». Ce procédé est très utilisé dans l'industrie pour obtenir des revêtements inorganiques (Levy 1970; O'Brian *et al.* 2001; Kalberlah and Mollah 2005; Sakurai and Togasaki 2005) et organiques (Winterton *et al.* 1999a).

La construction des multicouches se fait par pulvérisation des solutions de polyélectrolytes sur un substrat vertical ou légèrement incliné, permettant le drainage de l'excès de solution (Schlenoff *et al.* 2000). Une étape de pulvérisation d'une solution de rinçage suit chaque étape de pulvérisation de solution de polyélectrolytes (Figure 11). Lors

de la pulvérisation, la formation d'un film fin de liquide sur le substrat est observée. Le principal inconvénient de cette méthode est la forte consommation en solution. En effet, la majorité des solutions pulvérisées est perdue par drainage et n'est pas réutilisable par la suite.

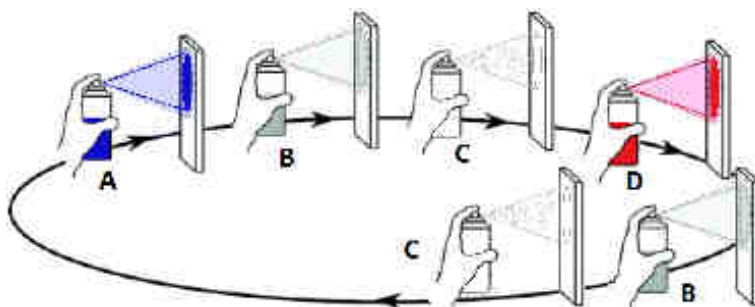


Figure 11 : Représentation de la méthode de pulvérisation, ou « spraying ». A, la solution de polycations, B, la solution de rinçage, C, la séchage avec de l'air ou du diazote à 2 bars (étape facultative) et D, la solution de polyanions.

Cette méthode ne convient donc pas pour le dépôt de composés coûteux. Par contre, l'un de ses atouts majeurs est le temps minimum requis pour la construction d'une bicouche. Ce temps n'est que d'une minute environ. La rugosité et l'épaisseur des films obtenus sont comparables à celles des films obtenus par trempage. Le flux des solutions pulvérisées, la distance de pulvérisation, les concentrations des solutions, la force ionique, le pH et la température sont des paramètres qui influencent la construction des films. Dans le cas où l'étape de rinçage est supprimée, l'épaisseur et la rugosité du film construit augmentent plus rapidement (Izquierdo *et al.* 2005).

Actuellement, cette technique de pulvérisation est utilisée par Ciba Vision© pour le traitement de surface des lentilles de contact afin de les rendre hydrophiles (Winterton *et al.* 1999b; Winterton 2002).

### 2.3.2.4 Comparaison des méthodes

Les avantages et inconvénients de ces différentes méthodes de dépôt sont répertoriés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Tableau exposant les avantages et inconvénients des différents procédés de dépôt.

Procédé	Temps requis pour une bicouche	Rugosité	Type de substrat	Consommation de solutions en volume
trempage	1200-2400 s	très faible	forme quelconque	négligeable
centrifugation	60 s	faible	substrat plat	très faible
Pulvérisation alternée	30 s	faible	substrat plat	grande

Le temps requis pour réaliser une bicouche est la principale différence entre ces procédés. La forme du substrat utilisé distingue cependant ces trois méthodes : seul le trempage permet de réaliser des revêtements sur un substrat quelque soit sa forme, tandis que la centrifugation requiert un substrat plat et la pulvérisation alternée peut être appliquée sur des substrats plats ou des fibres (Krogman *et al.* 2009). L'inconvénient majeur de la pulvérisation est la grande consommation de solution.

## 2.4. Complexes de polyélectrolytes : solution versus films multicouches

Les multicouches de polyélectrolytes peuvent être considérées comme un assemblage de complexes de polyélectrolytes. Il existe donc un lien entre les complexes de polyélectrolytes en solution et les propriétés des multicouches de polyélectrolytes (Sukhishvili *et al.* 2006).

### 2.4.1. Relation complexes / films multicouches

Diverses études ont été menées sur la relation entre complexes solubles de polyélectrolytes et multicouches. Elles ont conclu, notamment par RMN du solide, que les

---

procédés de formation des films de polyélectrolytes et des complexes en solution sont similaires (Dautzenberg *et al.* 1994; Dubas and Schlenoff 1999; Rodriguez *et al.* 2000; Smith *et al.* 2003). Les résultats de Boulmedais *et al.* sur un système polypeptidique (PLL/PGA) montrent que les structures secondaires des complexes de polypeptides sont similaires, aux films multicouches des mêmes polypeptides (Boulmedais *et al.* 2002).

#### 2.4.2. Relation complexation / régime de construction des films

Des mesures de microcalorimétrie en solution des polyanions et polycations ont permis de mettre en évidence la relation existante entre l'enthalpie de complexation et le type de régime de croissance (exponentielle ou linéaire) de la multicouche (Laugel *et al.* 2006). La croissance exponentielle d'une multicouche est liée à une complexation endothermique entre les deux composés, tandis qu'une complexation fortement exothermique engendre une croissance linéaire des multicouches. Une légère exothermie de la complexation entraîne une croissance légèrement exponentielle. Ceci s'explique en regardant le signe de la variation de l'enthalpie libre ( $\Delta G$ ) de la réaction. La formation d'un complexe de polyélectrolytes est spontanée si  $\Delta G$  est négatif. Or

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.1)$$

avec  $\Delta H$ , la variation d'enthalpie au cours de la réaction ;  $T$ , la température et  $\Delta S$ , la variation d'entropie au cours de la réaction. Dans notre cas, la contribution principale à  $\Delta S$  est due à l'expulsion des contre-ions :  $\Delta S > 0$ . Si la réaction est exothermique,  $\Delta H < 0$ , l'interaction entre polycations et polyanions, favorisée d'un point de vue enthalpique et entropique, est donc très forte. Les complexes ainsi que les films ont tendance à être très stables et denses. Les polyélectrolytes en solution n'interagissent qu'avec ceux de charge opposée présents à l'interface film/solution. La croissance est donc linéaire. Inversement, si

---

la réaction est endothermique  $\Delta H > 0$ , l'enthalpie s'oppose à l'entropie qui favorise la complexation entre polyélectrolytes complémentaires. Les interactions polycations/polyanions sont donc plus faibles. La densité du film construit est faible et permet la diffusion d'un des composés dans ces films. La croissance est ainsi exponentielle.

Le régime de croissance des films multicouches semble prévisible si la valeur de l'enthalpie libre de complexation entre les deux polyélectrolytes complémentaires est connue.

#### 2.4.3. *Compétition entre formation de complexes et formation de films LbL*

Nous avons vu que les interactions entre des polyélectrolytes de charges opposées menaient à la formation de complexes. Une densité minimale de charges des polyélectrolytes est nécessaire pour la formation de complexes ou la formation de la multicouche (Steitz *et al.* 2001; Glinel *et al.* 2002). Cette densité de charges peut être contrôlée soit par la force ionique (Dubas and Schlenoff 1999) soit par le pH des solutions dans le cas des polyélectrolytes faibles (Mendelsohn *et al.* 2000; Kharlampieva and Sukhishvili 2003; Kharlampieva *et al.* 2005). Dans le cas de la force ionique, le contrôle se fait par un écrantage plus ou moins prononcé des charges par le sel et par protonation ou non des groupements des polyélectrolytes par le pH. Plusieurs travaux ont décrit la destruction d'un film au profit de la formation de complexes solubles lors de changement de force ionique ou de pH (Hoogeveen *et al.* 1996; Sui *et al.* 2003; Ball *et al.* 2005; Hübsch *et al.* 2005). Kovacevic *et al.* ont montré la dissolution du film dans le cas du système poly(diméthylaminoéthyl méthacrylate)/poly(acide acrylique), lorsque le film était en contact avec une solution concentrée d'un des polyélectrolytes (Kovacevic *et al.* 2002). La

Figure 12 résume le comportement des complexes en solution et des films multicouches au contact d'une solution à force ionique donnée.

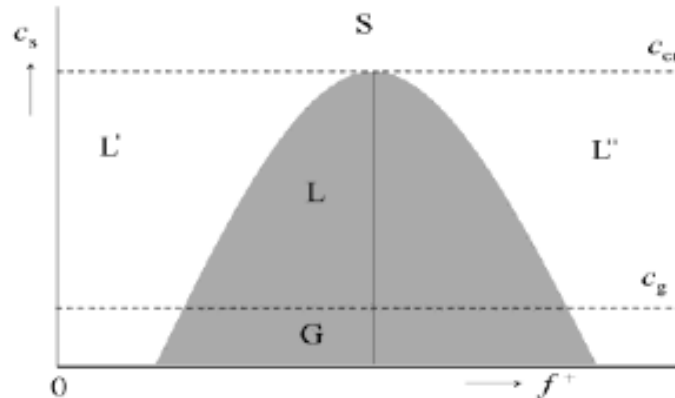


Figure 12 : Diagramme schématisant la stabilité des complexes de polyélectrolytes : la force ionique ou la concentration du sel en fonction de la fraction du polycation contenu dans le mélange polycation/polyanion, en solution. Les régions L et G indiquent, respectivement, l'état liquide et vitreux des multicouches. Les régions L' et L'' représentent les complexes de polyélectrolytes solubles. La région S est la partie du diagramme où aucune complexation entre les polyélectrolytes ne se produit (Kovacevic *et al.* 2002).

Lorsque la force ionique est supérieure à une valeur critique  $C_{Cr}$  (la région S), aucune complexation entre les polyélectrolytes ne se produit, que ce soit en solution ou dans les films multicouches. Cela s'explique par l'écrantage des charges intrinsèques des chaînes de polyélectrolytes par les charges extrinsèques du sel. L'écrantage réduit fortement l'attraction coulombienne (Dubas and Schlenoff 2001). En dessous de cette valeur critique de la force ionique, la complexation des polyélectrolytes a lieu. Ainsi, nous constatons l'apparition de deux régions L' et L'' correspondant, respectivement, à la formation de complexes solubles négatifs, dû à l'excès de polyanions, et positifs, dû à l'excès de polycations. Aux régions L et G correspond la formation des films multicouches où les complexes précipitent. Lorsque la force ionique est inférieure à  $C_g$  (glassy concentration), la mobilité des polyélectrolytes est faible, des complexes vitreux se forment (région G). Dans la région L, la mobilité des polyélectrolytes augmente avec la force ionique, située entre  $C_g$  et

Ccr, Cette zone décrit des complexes passant d'un état vitreux à un état plus liquide sous l'effet de l'augmentation de la force ionique (Kovacevic *et al.* 2002).

### *3. Films de polyélectrolytes obtenus par pulvérisation : de l'étape par étape au simultané*

La construction de films par le procédé de trempage demande un temps considérable d'adsorption des polyélectrolytes (de 5 à 20 minutes). Le temps de mise en œuvre était donc relativement long. Le procédé de pulvérisation a été développé principalement dans le but de réduire le temps de construction.

#### *3.1. Construction de multicouches par pulvérisation alternée de polycations et de polyanions : historique*

La construction de films par procédé de polyélectrolytes par pulvérisation alternée consiste à pulvériser alternativement une solution de polycations puis une solution de polyanions sur un substrat tenu verticalement pour permettre l'élimination de l'excès de produit par drainage. Les deux pulvérisations de polyélectrolytes sont séparées par une étape de rinçage. Publié pour la première fois par Schlenoff *et al.* (Schlenoff *et al.* 2000), ce procédé a été appliqué pour le système PDADMA/PSS. Les films obtenus par pulvérisation sont comparables en homogénéité et en composition à ceux obtenus par trempage. Le temps de construction est plus rapide et la pulvérisation est réalisable sur des surfaces plus grandes que par trempage. Par contre, l'inconvénient majeur est la perte de 99 % de la solution par drainage.

Malgré les avantages de cette méthode, ce n'est qu'en 2005 qu'elle a été à nouveau étudiée. Deux procédés de construction, par trempage et par pulvérisation alternée, ont été

---

comparés pour le système PAH/PSS (Izquierdo *et al.* 2005). Izquierdo *et al.* ont étudié l'influence de différents paramètres tels que le temps de pulvérisation, l'application ou non d'une étape de rinçage et la concentration des solutions sur la construction de ces films. La pulvérisation alternée conduit à l'obtention de films très homogènes même pour des étapes de pulvérisation courtes (2 s), avec une épaisseur plus régulière et une rugosité plus faible que les films obtenus par trempage. Il a également été montré que pour un temps donné de pulvérisation, l'épaisseur des films augmentait avec l'augmentation de la concentration des solutions de polyélectrolytes. L'épaisseur du film est alors conditionnée par la plus petite concentration des solutions de PAH et de PSS. Lorsque le rinçage n'est pas effectué, une légère augmentation d'épaisseur et de rugosité des films a été observée. La structure des films PAH/PSS construits par pulvérisation alternée a été étudiée par réflectivité de rayons X et de neutrons après incorporation de PSS deutéré lors de la construction des films (Felix *et al.* 2009). Une structure stratifiée et lisse des films a été mise en évidence. En modifiant le temps de pulvérisation et la concentration en sel pour le même système, les résultats obtenus par Kolasinska *et al.* quant à la rugosité sont opposés (Kolasinska *et al.* 2009). Le temps de pulvérisation dans le cadre de l'étude de Felix *et al.* était de 5 s pour une concentration en sel de 0,5M NaCl comparé à une pulvérisation de 2 s entrecoupée par 2 s de pause avec une concentration en sel de 0,15M NaCl pour Kolasinska *et al.*

Des vésicules de phospholipides intactes peuvent être incorporées par pulvérisation dans un film multicouche (Michel *et al.* 2006). Ces vésicules, constituées de POPC (1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine) et de POPG (1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidyl-DL-glycérol) rigidifiées avec du cholestérol, étaient stabilisées par la poly(lysine). Les liposomes pulvérisés enfermaient du ferrocyanure (sonde électro-active).



---

Aucun courant d'oxydation de la sonde n'a été détecté sur le film par voltampérométrie prouvant l'intégrité des liposomes.

L'intérêt de ce procédé de pulvérisation est grandissant (Hammond-Cunningham *et al.* 2007; Mjahed *et al.* 2008; Bruening and Dotzauer 2009; Krogman *et al.* 2009). En 2005, il a été utilisé pour couvrir des « stents » d'un revêtement de collagène/sirolimus (Chen *et al.* 2005). Pour rigidifier la matrice polymérique petite molécule/polyélectrolyte, la génipine, composé naturel de réticulation, a également été pulvérisée pendant la construction du film. Le procédé de trempage n'est pas envisageable ici pour obtenir un revêtement homogène car des agrégats de collagène se coincent dans le maillage du stent. Seule la pulvérisation permet d'obtenir un revêtement de qualité.

La pulvérisation alternée a permis le développement de la pulvérisation alternée réactive. Ce procédé a été introduit par Caruso (Caruso 2001; Shi *et al.* 2002) puis généralisé par Ball et ses collaborateurs (Laugel *et al.* 2007; Laugel *et al.* 2008). Ce procédé permet la construction de films nanocomposites par pulvérisation alternée de polyélectrolytes et de précurseurs d'oxyde, en particulier des alkoxydes. Par hydrolyse rapide en présence d'eau, les alkoxydes se condensent en nanoparticules d'oxyde permettant la formation de films nanocomposites polyélectrolyte/nanoparticules d'oxyde. Utilisé pour la première fois pour construire des nanocomposites de polyamine et de silice par pulvérisation alternée de solutions de polyamine et d'acide silicique (Laugel *et al.* 2007), ce procédé a été ensuite utilisé pour créer des films de polyamine et de nanoparticules de titane.

### *3.2. Applications des films obtenus par pulvérisation alternée*

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, le procédé de pulvérisation alternée a permis la création de matrice de polymère pour le développement de cartilage artificiel

---

(Mjahed *et al.* 2008; Mhanna *et al.* 2011), et la réalisation de substrats 3D à base de (PLL-HA) et de gel d'alginate pour la culture cellulaire (Mjahed *et al.* 2008). Certaines techniques expérimentales ont été modifiées pour l'étude de ce procédé de pulvérisation par exemple pour l'étude de l'évolution de l'épaisseur du film par adaptation d'une microbalance à cristal de quartz (Fukao *et al.* 2011).

Un revêtement multicouche photocatalytiquement actif pour la dégradation d'agents toxiques a été développé par Krogman *et al.* (Krogman *et al.* 2008b). Ces revêtements destinés à recouvrir des combinaisons de protection, sont mécaniquement stables et sont réalisés par pulvérisation alternée de solutions de nanoparticules de dioxyde de titane et de PDADMA. Les nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  décomposent sous l'effet de radiations UV par dégradation photocatalytique des molécules organiques toxiques comme celles des gaz innervants. Ces nouvelles combinaisons traitées sont plus confortables que celles actuellement utilisées, en caoutchouc, du fait de la nature du revêtement déposé. Les complexes ioniques permettent un meilleur transport de la vapeur d'eau au sein du matériau. Un autre revêtement photocatalytiquement actif grâce au  $\text{TiO}_2$  a été mis au point en 2009 par l'équipe de Hammond (Figure 13). Un tissu réalisé avec des fibres de nylon obtenues par électrospinning a été fonctionnalisé par pulvérisation alternée de nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  et PDADMA. Afin de créer une matrice polymérique protectrice, la pulvérisation de poly(amidoamine) (PAMAM) et de PAA a été réalisée pour la dernière étape (Krogman *et al.* 2009).

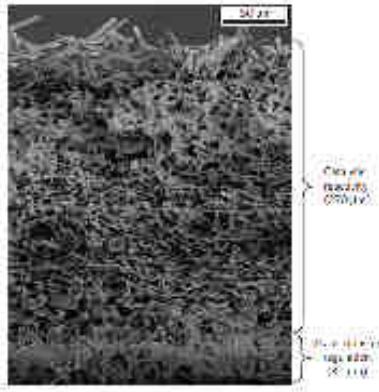


Figure 13 : Image de microscopie électronique à balayage d'une section du tissu de fibres de nylon actives photocatalytiquement réalisées par electrospinning et pulvérisation alternée (Krogman *et al.* 2009).

D'autres recherches sont menées pour améliorer l'activité photocatalytique des nanoparticules. Des nanotubes de titanate (TiNT) imprégnés avec  $WO_3$  ont été développés (Grandcolas *et al.* 2009). Ils absorbent davantage dans le visible que les TiNT sans  $WO_3$ . La pulvérisation alternée sur textiles de solutions de poly(éthylèneimine) (PEI) et de TiNT a permis la construction de multicouches homogènes sur les fibres textiles. Ces revêtements présentent également une bonne tenue mécanique à la friction et ont été testés avec de l'ypérite (gaz moutarde) et du M-diméthylméthylphosphonate (DMMP), un composé proche de l'ypérite. Après dépôt d'agents toxiques sur le textile, et exposition à la lumière plus ou moins prolongée du substrat, le matériel restant sur le textile a été analysé. Après seulement 20 min d'exposition et 7 min d'attente, les textiles fonctionnalisés montrent des propriétés d'auto-décontamination avec une disparition complète du DMMP. Ces propriétés d'auto-décontamination proviennent de l'évaporation du DMMP et de la dégradation photocatalytique liée à la présence des nanotubes de TiNT. Plus le nombre de bicouches est important, plus la décontamination est rapide. Avec moins de 10 bicouches de PEI/TiNT, tous les nanotubes participent à la dégradation photocatalytique. Des mesures XPS ont montré la présence de phosphate, dernier stade d'oxydation du phosphore par photocatalyse, après 2 heures d'éclairement des textiles fonctionnalisés et imprégnés de DMMP. Ces textiles

fonctionnalisés peuvent être totalement régénérés par lavage dans une solution à pH 12, ce qui prouve la bonne tenue mécanique de la multicouche PEI/TiNT, le PEI n'étant pas dégradé par la photocatalyse.

Le procédé de pulvérisation alternée est à l'étude pour de nombreuses autres applications notamment pour des revêtements « antisalissure » (antifouling) ou encore antiadhésif pour certains organismes vivants tels que les moules sur les coques des bateaux. Pour ces derniers, il s'agit principalement de contrôler la morphologie et la rugosité du film pour minimiser au maximum les interactions en minimisant le nombre de points de contact entre les micro-organismes et la surface. Pour cela une structure multicouche de PEI/PAA a été proposée par l'équipe du professeur Grunze (Cao *et al.* 2010). Le pH de la solution de PEI varie de 5 à 9 pour un pH de la solution de PAA de 2,9. Ce changement de pH permet la microstructuration du film. Le film est réticulé pour une meilleure tenue mécanique par chauffage sous vide à 160°C pendant 6 heures.

La pulvérisation alternée est également utilisée pour réaliser des revêtements anti-corrosion. Des surfaces métalliques recouvertes d'un film protecteur de multicouches de polyélectrolytes contenant des inhibiteurs de la corrosion ont été développées par l'équipe du professeur Möhwald. Lors de la dégradation par la corrosion, les inhibiteurs contenus dans les nanopores de la couche protectrice sont libérés. Comme des variations locales de pH (vers des pH acides ou basiques) lors de la corrosion peuvent apparaître : l'inhibiteur de corrosion est conservé dans le film à pH neutre et libéré uniquement lorsque le pH local est acide ou basique (Andreeva *et al.* 2008; Grigoriev *et al.* 2009; Lamaka *et al.* 2009). Certaines techniques hybrides apparaissent également. En combinant le procédé de centrifugation (spin-coating) et la pulvérisation alternée (spray-assisted LbL), Merrill et Sun développent le

---

« spin-spray layer-by-layer : SSLbL » (Merrill and Sun 2009). Les solutions sont pulvérisées pendant un temps donné sur le substrat en rotation continue à une vitesse de 3000 rpm. Après un court temps d'attente le substrat est rincé par pulvérisation de la solution de rinçage et séché par rotation. La pulvérisation de la seconde solution de polyélectrolytes peut ensuite être réalisée. Les pertes en solution de polyélectrolytes ne sont ici que de 50%. Ce procédé repose sur la rapidité d'étalement de la solution.

### 3.3. Construction de films par pulvérisation simultanée

Après avoir étudié la pulvérisation alternée, il s'est avéré que l'étape de rinçage entre les dépôts de polyélectrolytes n'était pas nécessaire, l'excès de solution étant éliminé par drainage (Izquierdo *et al.* 2005). La rugosité et l'épaisseur des films subissent une légère augmentation en comparaison aux mêmes films obtenus par pulvérisation alternée en conservant l'étape de rinçage. Les auteurs Schuetz *et al.* ont également prouvé qu'il était possible de construire des films par trempage alternée de complexes de polyélectrolytes et de polyélectrolytes (Schuetz and Caruso 2002). Au vu de ces résultats, il devrait donc être possible de pulvériser simultanément des solutions de polyanions et de polycations pour former un film. La première étude de pulvérisation simultanée porte sur le système PAH/PGA et a été réalisé par Porcel *et al.* en 2005. Ce système, qui possède une croissance exponentielle par construction alternée, présente une croissance linéaire lors de la construction par pulvérisation simultanée (Porcel *et al.* 2005). Ce n'est qu'en 2010 que Lefort *et al.* généralisent ce procédé à presque tous les systèmes chargés : polyélectrolyte/polyélectrolyte, polyélectrolyte/nanoparticules, polyélectrolyte/petite molécule chargée et inorganique/inorganique. Dans le dernier cas, la construction de films inorganiques est obtenue par formation d'un film liquide sursaturé (Lefort *et al.* 2010). En

2011, ces mêmes auteurs étudient en détail la construction par pulvérisation simultanée du système PAH/PSS qui est linéaire (Lefort *et al.* 2011). Le paramètre le plus important pour la construction par pulvérisation simultanée apparaît être le rapport des flux pulvérisés des composés. La vitesse de croissance des films augmente jusqu'à un maximum pour un rapport de flux pulvérisé optimal, puis diminue pour des rapports supérieurs. Malgré une forte dépendance de la vitesse de croissance avec le rapport pulvérisé en composés, des analyses XPS ont montré que le rapport des polyanion/polycation dans le film est toujours de 1:1, la compensation intrinsèque des charges est ici totale. La pulvérisation simultanée apparaît être une bonne alternative pour la construction rapide de films lorsqu'aucune stratification n'est souhaitée.

#### *4. Applications des films multicouches dans le domaine des biomatériaux*

Pour pallier à l'un des problèmes de santé publique les plus importants et les plus coûteux de notre époque (Langer and Vacanti 1993), la recherche sur les biomatériaux a été développée pour préserver l'intégrité et le confort de vie des personnes souffrant de déficiences fonctionnelles d'un organe ou d'un tissu.

##### *4.1. Biomatériaux*

En 1986, la Conférence de la Société Européenne des Biomatériaux à Chester définit les biomatériaux : « Les biomatériaux sont des matériaux non vivants, utilisés dans un appareil médical, et conçus pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'ils participent à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle ».

Les biomatériaux vont des dispositifs médicaux à usage unique aux prothèses. Ils se définissent par l'usage auquel ils sont destinés et non pas par une nature particulière. Ces biomatériaux peuvent être synthétiques (alliage métallique, céramiques, matières plastiques) ou d'origine naturelle tels que le collagène ou la cellulose.

Lors de l'implantation d'un biomatériau, la reconnaissance du matériau par les protéines puis par les cellules sont les premières interactions corps/matériau rencontrées. Il est donc nécessaire de contrôler les adhésions biomatériau/tissu pour éviter une réaction inflammatoire ou allergique, une infection bactérienne ou encore un phénomène de thrombose lors de l'implantation d'un corps étranger. Lorsqu'une réaction inflammatoire chronique se développe ou qu'une infection bactérienne est déclarée, le retrait de l'implant est souvent nécessaire. Le nouvel enjeu dans ce domaine est l'élaboration de matériaux dont les propriétés mécaniques et structurales sont adaptées à leur future application mais également qui interagissent de manière active avec le milieu vivant environnant. Un contrôle des réponses de ce matériau est recherché pour permettre de minimiser les réactions du corps face à cet élément étranger et de moduler l'activation des cellules du système immunitaire (Ratner 1996; Ratner and Bryant 2004). Ces matériaux, dits «bioactifs», interagissent avec les cellules et induisent une réponse spécifique des tissus environnants.

Afin de limiter les phénomènes de rejets, les biomatériaux doivent être biocompatibles. La biocompatibilité est définie comme la capacité du matériau à être accepté par l'organisme. Récemment, la recherche s'est tournée vers l'élaboration de composés biodégradables lorsque leur présence n'est nécessaire que pour un temps donné. Les stents biorésorbables (Zilberman and Eberhart 2006), les fils de suture synthétiques résorbables tels que le *Vicryl*<sup>®</sup> ou le *Dexon*<sup>®</sup>, les membranes biodégradables pour la

---

cicatrisation des plaies (Jürgens *et al.* 2006), ou encore les éponges pour la régénération du tissu osseux (Freed *et al.* 1993; Ishaug *et al.* 1997) se trouvent maintenant sur le marché.

#### 4.2. Adhésion cellulaire sur les films multicouches

Les films multicouches peuvent servir de revêtements aux biomatériaux pour permettre un contrôle de la réponse du milieu environnant à l'implantation d'un biomatériau. Dans cette optique, la compréhension et l'étude du comportement des cellules, tumorales et primaires, vis-à-vis de ces films sont importantes. En effet, en fonction de l'application souhaitée, le biomatériau devra être adhérent ou non pour les cellules. Lorsque la migration cellulaire doit être favorisée pour régénérer un tissu lésé, le matériau sera préférablement non adhérent. A l'inverse, pour permettre l'intégration *in vivo* d'un implant à la suite de l'ablation d'un organe, il faut parfois favoriser l'adhésion de cellules saines tout en défavorisant celle des cellules tumorales qui peuvent être encore présentes dans les tissus environnants.

##### 4.2.1. Adhésion sur des films à base de polyélectrolytes synthétiques

Un des moyens de contrôler l'adhésion des cellules sur un film PAH/PAA est la modification du pH de construction. Mendelsohn *et al.* ont étudié l'adhésion de fibroblastes de souris (NR6WT) sur ces films à base de deux polyélectrolytes faibles, en fonction du pH (Mendelsohn *et al.* 2003). Une construction à pH 6,5 du film permet une bonne adhésion des fibroblastes alors que le même film construit à pH 2 est non adhérent. Cet effet du pH est lié à l'hydratation des films. A pH 2, le PAA est faiblement ionisé, les films sont épais, très hydratés et leur capacité de gonflement est importante. A l'opposé, pour des films construits à pH 6,5, le PAA est plus fortement ionisé, les films sont alors moins épais et moins hydratés. Le degré d'hydratation des films influence donc la capacité des cellules à adhérer sur la



surface. Les films peu ionisés possèdent une interface film/milieu très hydratée et sont alors considérés comme un mur d'eau par les cellules qui n'y adhèrent pas. Ils ont également montré que la quantité de protéines adsorbées sur les films est indépendante du pH de construction. Dans ce cas, il n'y a pas de lien entre adhésion cellulaire et adsorption de protéines.

- D'autres études ont été menées sur le système PAH/PSS. Les films PAH/PSS ont été construits sur des gels de polydiméthylsiloxane (PDMS) par la technique de microfluidique. Puis, l'adhésion de cellules neuronales murines a été étudiée. Sur les surfaces de PDMS initialement non adhérentes, ces cellules se montrent plus adhérentes et prolifèrent préférentiellement sur les surfaces modifiées et terminées par PAH (Reyes *et al.* 2004). En 2007, Kerdjoudj *et al.* ont réalisé des dépôts de PAH/PSS à l'intérieur d'artères de cordons ombilicaux humaines et testé l'adhésion et l'étalement de cellules endothéliales. La présence des films multicouches améliore la viabilité et l'étalement des cellules endothéliales qui conservent leur phénotype (Kerdjoudj *et al.* 2007).

#### *4.2.2. Adhésion sur des films à base de biopolymères (polypeptides et polysaccharides)*

L'adhésion des cellules a également été étudiée sur des films de polymères naturels. Des études sur des films multicouches de chitosane CHI/HA ont été menées et mettent en évidence la faible adhésion de plaquettes et leucocytes (Thierry *et al.* 2003), de chondrosarcomes (Richert *et al.* 2004b), de préostéoblastes MC3T3 (Hillberg *et al.* 2009) ou de cellules souches dérivées de moelle osseuse (Liu *et al.* 2010). Pour tous ces auteurs, la

faible adhésion et prolifération des cellules sur les films CHI/HA est principalement due aux propriétés mécaniques de ces films, qui ne sont pas assez rigides.

En 2004, Richert *et al.* ont analysé l'influence de la réticulation de films PLL/HA sur l'adhésion de cellules de chondrosarcome (Richert *et al.* 2004a). La réticulation a été effectuée chimiquement à l'aide de carbodiimide (diméthylaminopropylique) éthylique (EDC) et N-hydroxysuccinimide (NHS) pour former des liaisons amides entre les groupements amines de la PLL et les groupements carboxyliques du HA. La réticulation permet de rendre les films plus résistants à l'enzyme hyaluronidase et plus rigides. Ces auteurs ont également noté que contrairement aux films non réticulés qui étaient anti-adhérents vis-à-vis des cellules, les films réticulés permettaient une bonne adhésion et un bon étalement des chondrosarcomes.

#### *4.3. Insertion de molécules actives dans un film*

Afin de rendre les biomatériaux bioactifs pour induire une réponse appropriée *in vivo*, il faut ajouter ou greffer des molécules bioactives telles que des protéines, des peptides ou des médicaments.

##### *4.3.1. Adsorption et absorption de molécules*

Les films multicouches sont construits par adsorption de polyanions et polycations. Ceci permet donc d'incorporer une grande variété de molécules chargées (particules, molécules inorganiques, protéines...) soit par diffusion des molécules à partir de la surface dans le film, soit par intégration des molécules dans la structure du film en tant que couche.

Une méthode consiste à créer des films réservoirs qui pourront contenir des molécules actives. Berg *et al.* ont pu rendre un film poreux par traitement à différents pH après construction alternée de blocs PAH/PAA et PAH/PSS et y inclure de la ketoprofène et

de la cytochalasine D (Berg *et al.* 2006). Les films à croissance exponentielle PLL/HA réticulés peuvent servir de réservoir aux molécules actives (Crouzier *et al.* 2010). La quantité de molécules actives est modulée en variant le nombre de couches du film et la libération se fait par modification du milieu ou dégradation progressive du film. Ainsi des multicouches de PLL/PGA, dans lesquelles a été insérée une couche de protéine A, ont été construites (Jessel *et al.* 2003). Cette protéine est issue de la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus* et possède une large gamme d'activités biologiques, notamment anti tumorale, antifongique et antiparasitique pour ne citer que celles-ci. Quelque soit la profondeur de la protéine A, celle-ci reste active et accessible aux cellules THP-1 à plus ou moins long terme. Le film est dégradé progressivement lors de sa mise en contact avec les cellules, ce qui permet à celles-ci d'atteindre la protéine A (Figure 14).

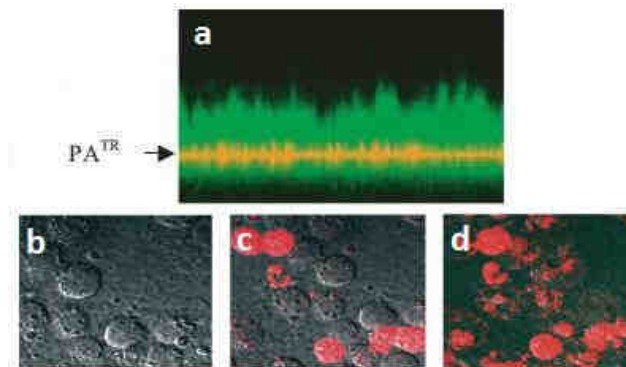


Figure 14 : Image de microscopie confocale (a) coupe en z d'un film multicouche (PEI-PGA-PLL-PA<sup>TR</sup>-(PGA/PLL)<sub>19</sub>-PGA-PLL<sup>FITC</sup>) après 18h de contact avec des cellules THP-1 avec PA<sup>TR</sup> = protéine A modifiée par du Texas Red. (b-d) Internalisation de PA<sup>TR</sup>, initialement recouvert par 20 bicouches de PGA/PLL, par les cellules THP-1 à (b) 0 min, (c) 180 min et (d) 15h (Jessel *et al.* 2003).

Ces films peuvent donc être fonctionnalisés avec une grande variété de produits actifs en fonction de l'effet souhaité, ce qui les rend très attractifs.

#### 4.3.2. Insertion par couplage de la molécule

Une des autres méthodes pour insérer une molécule active dans un film est de la coupler avec un des composants du film. L' $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone),

---

peptide anti-inflammatoire, a ainsi été intégré avec succès dans des films multicouches de PLL/PGA tout en restant actif (Chluba *et al.* 2001). L' $\alpha$ -MSH a été greffé sur la PLL. En 2005 ce peptide est couplé covalamment par fonctionnalisation thiol avec le PGA pour créer des prothèses de trachée biologiquement active (Schultz *et al.* 2005; Fioretti *et al.* 2010). L'activité anti-inflammatoire de l' $\alpha$ -MSH a pu être démontrée *in vivo* par détection d'IL-10 présent uniquement chez les rats implantés de trachée fonctionnalisée.

Chua *et al.* ont également fonctionnalisé des implants en titane par des multicouches de CHI/HA modifié avec un peptide RGD pour éviter l'adhésion bactérienne, grâce au CHI, et favoriser l'adhésion cellulaire grâce au peptide RGD (Chua *et al.* 2008). Le peptide a été inséré par immersion de substrats de titane recouvert de cinq bicouches de CHI/HA terminé par CHI dans une solution du peptide contenant du carbodiimide (diméthylaminopropylque) éthylique (EDC) et du N-hydroxysuccinimide (NHS) permettant de coupler le RGD sur la surface de CHI. Les implants ainsi traités permettent d'augmenter la prolifération des ostéoblastes et l'activité de l'alkaline phosphatase tout en maintenant une grande efficacité antibactérienne.

#### 4.3.3. Stratégies de protection de la molécule insérée

Il est également possible d'utiliser des cyclodextrines pour intégrer des molécules hydrophobes dans un film. Les cyclodextrines vont solubiliser les molécules hydrophobes dans l'eau par insertion dans leur cage hydrophobe. Ainsi il a été possible d'introduire un anti-inflammatoire, le piroxicam, dans une multicouche de PLL/PGA (Jessel *et al.* 2004). L'activité des films a été évaluée par l'inhibition du TNF- $\alpha$  produit par des monocytes cultivés sur ces films. L'activité du piroxicam est conservée dans le film. Les films ainsi construits possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui peuvent être modulées en fonction de

---

l'architecture du film. La quantité de molécules insérées est cependant difficilement quantifiable.

Une autre technique consiste à créer des micro-domaines hydrophobes dans l'architecture des films. L'équipe de Glinel a ainsi incorporé un colorant hydrophobe, Rouge du Nil, dans une multicouche de PEI/carboxyméthylpullulane (CMP) (Guyomard *et al.* 2006). En modifiant le CMP par greffage de chaînes alkyles, l'équipe a élaboré des domaines hydrophobes dans lesquels les molécules de colorant vont pouvoir se placer. Le chargement en colorant du film se fait soit par diffusion de celui-ci dans le film par contact avec la solution, soit par complexation préalable entre le colorant et les polymères CMP (polyanion). La libération du Rouge du Nil est déclenchée par modification du milieu environnant (concentration en sel par exemple).

#### *4.3.4. Libération de la molécule active*

Après insertion de la molécule dans les films multicouches, différentes voies peuvent être utilisées pour la libérer influençant la composition du film.

Une première étude s'est intéressée à la dégradation par hydrolyse des films (Wood *et al.* 2005). Les films ont été construits par dépôt alterné à pH 5,1, par la méthode classique de trempage, de solutions de poly( $\beta$ -amino-ester) dégradables et d'héparine ou de chondroïtine sulfate comme polyanions. Après gonflement des films, la dégradation se produit lors de l'immersion de ces derniers dans une solution tampon de pH supérieur au pH de construction (immersion à pH 6,2). Le profil de dégradation est linéaire. Les propriétés de libération du film ont été étudiées en mesurant la quantité d'héparine radio-marquée, préalablement introduite au cours de la construction, libérée au cours du temps. Shukla *et al.* ont ainsi développé des films multicouches par adsorption successive de poly( $\beta$ -amino

---

ester), d'un polysaccharide anionique (acide alginique, chondroïtine sulfate ou dextran sulfate) et d'un peptide antimicrobien cationique (ponericine G) inséré entre deux couches de polysaccharides (Shukla *et al.* 2010). Une libération du peptide a été observée durant une dizaine de jours avec différents profils de libération en fonction du taux de chargement de départ. L'activité du peptide est conservée, les films sont biocompatibles et permettent le développement cellulaire de fibroblastes NIH 3T3 et de cellules endothéliales humaines du cordon ombilical. Ces films présentent un grand intérêt pour le revêtement d'implants ou de pansements pour prévenir la prolifération bactérienne.

Plusieurs équipes ont ensuite développé des films dégradables par stimuli électriques : celle du professeur Hammond (DeLongchamp and Hammond 2004) et celle du professeur Vörös (Boulmedais *et al.* 2006; Guillaume-Gentil *et al.* 2010). DeLongchamp et Hammond utilisent les différents états d'oxydation du bleu de Prusse (BP) pour conférer à des films PEI linéaire/bleu de Prusse des propriétés d'électrochromisme et de dissolution progressive contrôlée en fonction du degré d'oxydation du BP et du nombre de cycles redox appliqué au film. Le BP devient neutre lorsqu'il est réduit. Une première étude sur PLL/HEP a montré la possibilité de dissoudre les films à 1,8 V (Boulmedais *et al.* 2006). Par application d'un potentiel électrique sur des multicouches de PLL/HA ou de PSS/PAH, Guillaume-Gentil *et al.* ont montré que les films PLL/HA se dissolvaient continuellement. Les films PSS/PAH quant à eux se dissolvent uniquement si leur épaisseur ne dépasse pas quelques dizaines de nanomètres. Dans le cas contraire, il se produit une délamination à partir de l'électrode. La dissolution ou la délamination est provoquée par la production de protons à l'interface électrode/film due à l'hydrolyse de l'eau. Cette production de protons modifie localement le pH et déstabilise le film qui va se dégrader et permettre la libération des molécules insérées dans le film.

En 2009 apparait la technique de libération activée par infrarouge (Volodkin *et al.* 2009). Des nanoparticules d'or, des microcapsules et des molécules d'ADN ont été insérées dans des multicouches PLL/HA et PAH/PSS. Les films PLL/HA se révèlent avoir une plus grande capacité d'incorporation de l'ADN que PSS/PAH. Ces revêtements ont la possibilité de libérer les molécules d'ADN insérées par activation des nanoparticules d'or par illumination dans le proche infrarouge. Le film se détruit localement par augmentation de la température due à l'irradiation. Le même phénomène a été observé avec des microcapsules incorporant du dextran et des nanoparticules d'or (Volodkin *et al.* 2009).

#### *4.4. Propriétés antibactériennes des films multicouches*

##### *4.4.1. Propriétés antibactériennes passives*

La plupart des micro-organismes se développent non pas en solution mais sur un support qui permet le développement de la population microbienne et la colonisation du matériau. Les différentes étapes de la formation d'un biofilm sont décrites par Silverstein and Donatucci pour divers biomatériaux, cathéters, valves cardiaques... (Silverstein and Donatucci 2003). La population microbienne peut ainsi attaquer les tissus corporels environnants, entraîner des infections qui peuvent déboucher sur la dépose de l'implant et mettre le pronostic vital du patient en jeu. Différentes études ont permis de créer des multicouches résistantes à l'adhésion bactérienne. Notamment, une étude a mis en évidence le caractère antiadhésif de multicouches PLL/PGA terminées par plusieurs couches de PLL/PGA greffé par du poly(éthylène glycol) (PLL/PGA-g-PEG) (Boulmedais *et al.* 2004). Le PEG est en effet une molécule hydrophile et son hydratation permet d'éviter l'adhésion bactérienne. Reisch *et al.* ont également proposé une autre approche pour rendre les surfaces non adhérentes vis-à-vis des cellules et des fongiques (Reisch *et al.* 2008; Reisch *et*

---

*al.* 2010). Le recouvrement de surface par dépôt de multicouches de polyélectrolytes modifiés par des chaînes d'oligoéthylène glycol ou de phosphorylcholine. L'adsorption de protéines est également fortement réduite voire supprimée (Reisch *et al.* 2008).

Le chitosane, polymère hydrophile obtenu industriellement par *N*-déacétylation de la chitine, possède également des propriétés antimicrobiennes envers une large gamme de champignons, d'algues et de quelques bactéries. Son activité bactériostatique et bactéricide a été étudiée pour contrôler la croissance d'algues et la multiplication de virus (Rabea *et al.* 2003).

#### 4.4.2. Propriétés antibactériennes actives

Les films peuvent être rendus actifs par insertion de molécules donnant la propriété antibactérienne. En effet, l'équipe du professeur Rubner a développé des films antibactériens par insertion de nanoparticules d'argent dans des multicouches de PAH/(PAA/polyacrylamide (PAAm)) (Lee *et al.* 2005). La zone d'inhibition augmente lorsque l'épaisseur des films augmente, ce qui peut être décrit par un simple modèle de diffusion. L'équipe a également montré que la libération d'ions argent, responsables des propriétés antibactériennes, était contrôlée par un mécanisme d'oxydation à la surface des nanoparticules. Le dépôt de ces couches sur des microsphères magnétiques permet une libération de l'agent antibactérien à des sites spécifiques. En 2008, Malcher *et al.* ont utilisé les propriétés antibactériennes des ions argent encapsulés dans des liposomes insérés dans des films PLL/HA (Malcher *et al.* 2008). Ces matériaux ont été testés sur des souches d'*Escherichia coli*. Une réduction de 4 ordres de grandeur du nombre de bactéries vivantes a été observée après 120 min de contact pour les films contenant des liposomes chargés en



---

AgNO<sub>3</sub>. L'action bactéricide serait due à la diffusion des ions argent à travers le film sous l'effet de la température.

Il est également possible d'incorporer des antibiotiques dans les multicouches (Chuang *et al.* 2008). Ainsi l'équipe du professeur Hammond a construit des films de polyélectrolytes contenant de la gentamicine, antibiotique utilisé dans le traitement des infections bactériennes à test de Gram négatif. Des quadruples couches de [poly( $\beta$ -amino ester)/HA][gentamicine/HA] ont été construites par la méthode de trempage. Ce traitement s'est révélé efficace pour lutter contre *Staphylococcus aureus* et sans être toxique vis-à-vis d'ostéoblastes de cellules murines MC3T3. Guyomard *et al.* ont incorporé la gramicidine A dans des films de polyélectrolytes pour les rendre bactéricides (Guyomard *et al.* 2008). Après complexation de ce peptide avec du carboxyméthylpullulane (CMP), les multicouches sont élaborées avec les complexes peptide/CMP négativement chargés et la PLL. La quantité de peptide intégré est modulée par changement du nombre de couches déposées. L'activité antibactérienne résulte de deux phénomènes : le contact entre les bactéries et le film d'une part et la libération du peptide dans la solution environnante d'autre part.

Il est donc possible d'intégrer de nombreuses molécules dans les films multicouches et de les libérer pour leur conférer différentes propriétés.

Dans cette thèse, nous aborderons l'étude physico-chimique de films à base de polysaccharides obtenus par pulvérisation alternée et simultanée. Ces films ont été étudiés du point de vue de leur biocompatibilité. Les films du couple le plus prometteur, du point de vue de la biocompatibilité, ont été fonctionnalisés par un peptide antibactérien et antifongique pour des applications dans le domaine des biomatériaux.

Le chapitre suivant expose les matériels et méthodes utilisés durant la thèse.

## Chapitre II Matériels et Méthodes

### 1. Matériels

Les produits chimiques utilisés durant ma thèse ont principalement été fournis par:

- Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France.
- BioPolymer AS Novamatrix, Sandvika, Norvège.
- Alfa Aeser, Karlsruhe, Allemagne.
- Lifecore Biomedical, Chaska, Minnesota, Etats-Unis.
- Novabiochem, Darmstadt, Allemagne

#### 1.1. Les polysaccharides

##### 1.1.1. Le chitosane

Le chitosane (CHI) est l'un des seuls polysaccharides naturels cationiques. Il est obtenu par déacétylation totale ou partielle de la chitine, un des composants principaux de l'exosquelette d'insectes ou d'arthropodes, de l'endosquelette des céphalopodes ou de la paroi des champignons. Il est composé d'unité D-glucosamine liée en  $\beta$ -(1-4) (unité déacétylée) et de N-acétyl-D-glucosamine (unité acétylée) (Figure 15). Le degré de déacétylation (DDA) définit le pourcentage d'unités déacétylées par rapport au nombre d'unités total.

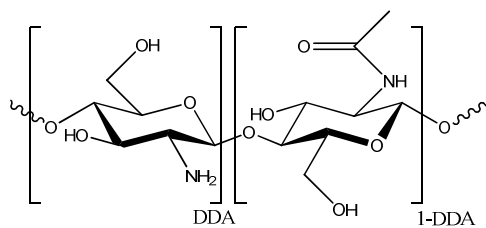


Figure 15 : Structure chimique du chitosane

Le CHI utilisé est un sel de chlorure fourni par Novamatrix (PROTASAN Ultrapure Chitosan CI 213), de masse molaire  $260\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  et de degré de déacétylation (DDA) 83%. Les solutions de CHI ont été, sauf mention contraire, préparées à la concentration de  $0,3\text{ mg/mL}$  dans  $0,15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de NaCl et ajustées à pH 4 à l'aide de solutions diluées de NaOH et HCl.

### 1.1.2. L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (hyaluronic acid HA) appartient à la famille des glycosaminoglycanes, polysaccharide non ramifié composé d'unités disaccharidiques répétitives. C'est un polysaccharide chargé négativement grâce à ses groupements carboxyliques sur les chaînes latérales. Il est composé de N-acétyl-D-glucosamine et d'acide  $\beta$ -glucuronique (Figure 16).

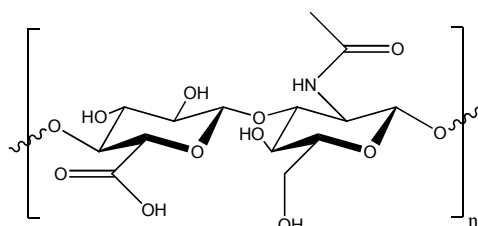


Figure 16 : Structure chimique de l'acide hyaluronique

Le HA utilisé pour cette étude provient de Lifecore Biomedical (réf.HA420K) et est un hyaluronate de sodium de  $420\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Les solutions d'HA ont été, sauf mention contraire, préparées à la concentration de  $0,3\text{ mg/mL}$  dans  $0,15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de NaCl et ajustées à pH 4 à l'aide de solutions diluées de NaOH et HCl.

### 1.1.3. L'acide alginique (dit « alginate »)

L'alginate (ALG) est un polysaccharide découvert par Stanford en 1881 dans l'algue *Laminaria digitata*, sous la forme d'acide alginique. L'alginate est produit presque uniquement par les algues brunes et constitue une part importante de la structure membranaire de leurs cellules.

Les alginates sont des copolymères binaires linéaires composés de monomères acide  $\beta$ -D-mannuronique (M) et acide  $\alpha$ -L-guluronique (G). Ces derniers sont liés par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1-4) et  $\alpha$ -(1-4) (Figure 17). Les motifs M et G sont organisés en blocs, formant ainsi des séquences répétitives donnant leurs propriétés aux chaînes d'alginate (Haug and Smidsrod 1965). La structure des alginates dépend fortement du rapport du nombre de monomères mannuronate sur le nombre de monomères guluronate, noté M/G. Ce rapport, généralement situé entre 0,25 et 2,25 (Ji *et al.* 1984), varie selon l'origine de l'alginate et les traitements qu'il a subi.

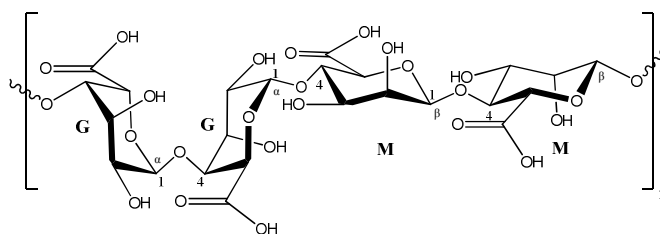


Figure 17 : Schéma représentant la structure chimique de l'alginate. M est l'acide  $\beta$ -D-mannuronique, G est l'acide  $\alpha$ -L-guluronique, liés par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1-4) et  $\alpha$ -(1-4).

L'ALG utilisé ici est un sel de sodium d'acide alginique fourni par Alfa Aesar (réf. A18565), de très faible viscosité et d'environ  $70\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Les solutions d'ALG ont été, sauf mention contraire, préparées à la concentration de  $0,25\text{ mg/mL}$  dans  $0,15\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  de NaCl et ajustées à pH 4 à l'aide de solutions diluées de NaOH et HCl.

### 1.1.4. La chondroïtine sulfate

La chondroïtine sulfate (CS) est un glycosaminoglycane qui compose la matrice du cartilage composé d'unité acide glucuronique  $\beta$ -(1-3) N-acétyl galactosamine 6 sulfate (Figure 18).

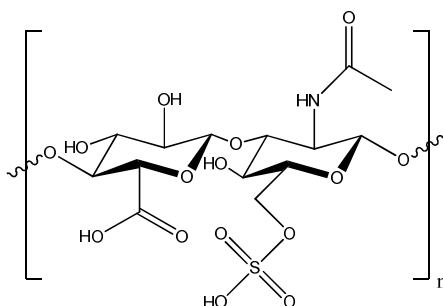


Figure 18 : Structure chimique de la chondroïtine sulfate

La CS utilisée est un sel de sodium provenant du cartilage de requin fournie par Sigma Aldrich (réf. C4384-1G) de masse molaire  $\sim 70\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Les solutions de CS ont été, sauf mention contraire, préparées à la concentration de  $0,35\text{ mg/mL}$  dans  $0,15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de NaCl et ajustées à pH 4 à l'aide de solutions diluées de NaOH et HCl.

### 1.2. Peptides

Afin de fonctionnaliser les films de polysaccharides, le greffage de la cateslytine (CGA344-358, bovine), un peptide de 15 acides aminés multifonctionnel dérivé de la chromogranine A, de séquence RSMRLSFRARGYGFR, a été réalisé sur l'acide hyaluronique. Les peptides ont été synthétisés par l'équipe de M.-H. Metz-Boutigue (INSERM UMR 977). Les acides aminés utilisés pour cette synthèse proviennent de Novabiochem. Pour pouvoir effectuer le greffage, une cystéine a été ajoutée lors de la synthèse en C terminal (+ C en C term). Ce peptide greffé possède une masse molaire de  $1963,3\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Figure 19).



Figure 19 : Séquence de la cateslytine bovine avec ajout d'une cystéine en C terminal

## 2. Préparations des films

### 2.1. Les substrats utilisés

En fonction des techniques d'élaboration ou de caractérisation et de l'utilisation des échantillons, deux types de substrats ont été utilisés pour la construction des films.

- les films qui nécessitaient des mesures d'épaisseur par ellipsométrie et des études de topographie par microscopie à force atomique (AFM), ont été construits sur des substrats de silicium. Ces substrats ont été découpés en rectangle de 1 cm × 4 cm à partir de « wafers » de silicium fournis par Wafernet, Inc. (San José, USA).
- les échantillons destinés à la culture cellulaire ou aux études bactériologiques ont été réalisés sur lamelles de verre de 14 mm de diamètre puis entreposés dans des plaques 24 puits Cellstar® (Greiner Bio-one, réf 622 160).

### 2.2. Préparation des substrats

Les substrats de silicium nécessitent un traitement de surface afin de les rendre hydrophiles. Ce traitement de surface consiste tout d'abord en un rinçage à l'éthanol puis à l'eau Milli-Q®. Après séchage à l'azote ou à l'air comprimé, les substrats sont ensuite placés dans un réacteur à plasma conçu pour nettoyer les surfaces (Harrick Plasma-cleaner, Ithaca, New York, USA). Un vide primaire est établi. Les substrats sont ensuite exposés à un plasma

---

composé de l'air résiduel contenu dans le réacteur, réalisé à l'aide d'ondes radiofréquences de puissance moyenne pendant trois minutes.

Les lamelles de verre, quant à elles, sont également traitées de manière à les rendre hydrophiles par immersion tout d'abord dans une solution de SDS à  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup> pendant 5 minutes avec ultrasons (de fréquence ultrasonique 35 kHz). Après rinçage à l'eau distillée, elles sont ensuite plongées dans l'acide chlorhydrique à 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pendant 10 minutes à 100°C suivi de plusieurs rinçages à l'eau distillée. Les lamelles de verre sont conservées au réfrigérateur dans de l'eau ultra pure avant utilisation.

### *2.3. Procédé de construction des films par pulvérisation alternée ou simultanée automatique*

Tous les films de polysaccharides, hormis les multicouches fonctionnalisés, ont été obtenus par le processus de pulvérisation alternée ou simultanée automatique. Le procédé ainsi que le dispositif de pulvérisation automatique (Figure 20) ont été développés au sein de l'équipe, en forte collaboration avec l'unité INSERM UMR 977, pour améliorer la reproductibilité et minimiser l'exposition de l'expérimentateur aux aérosols chimiques (Lefort 2011b). L'automate permet également un gain de temps conséquent lors de la réalisation de films épais. Le pulvérisateur automatique est composé de cinq buses de pulvérisation : trois buses permettent de pulvériser trois composés différents, une autre sert au rinçage des échantillons à l'eau Milli-Q® et la dernière effectue le séchage au diazote comprimé. Les buses de pulvérisation de l'automate sont des aérographes double action Paasche VL (Paasche) dont l'action est contrôlée par des électrovannes. Un porte-substrat, grâce à deux moteurs 12 V, permet de créer un mouvement de translation verticale et de rotation, ce qui conduit à une meilleure homogénéité des échantillons. La totalité du

système est piloté par un logiciel via un contrôleur électronique alimenté en 24 V continu pour des raisons de sécurité lié à l'environnement humide.

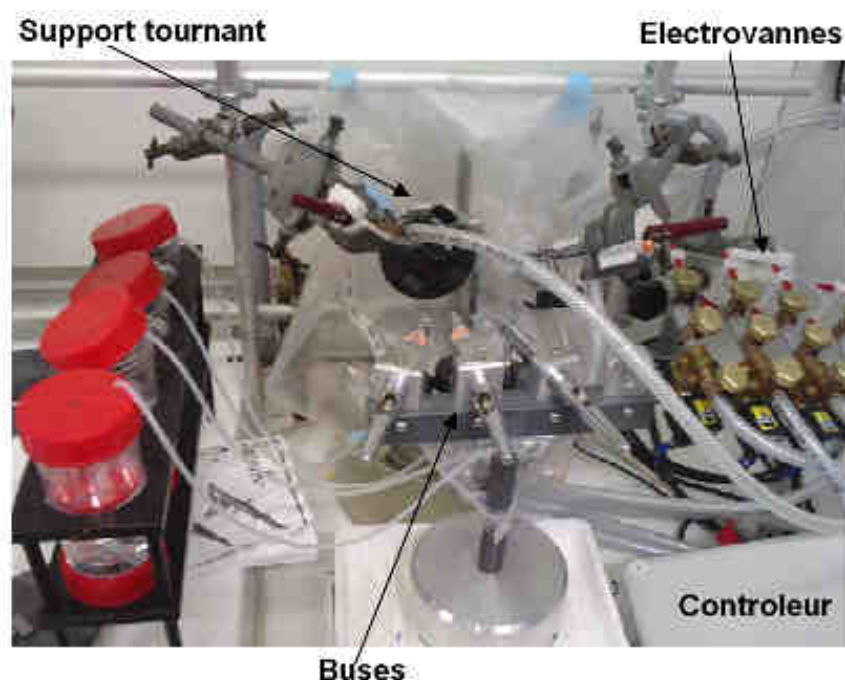


Figure 20 : pulvérisateur automatique réalisé au sein du laboratoire

Pour réaliser les films, une suite de  $n$  cycles identiques, composés de plusieurs étapes, se succèdent. Les solutions sont pulvérisées grâce à la pression de 2 bars d'un gaz, le diazote dans notre cas. La première étape d'un cycle consiste à pulvériser la ou les solutions de polyélectrolytes durant cinq secondes. La seconde est un rinçage de cinq secondes à l'eau Milli-Q® (pH 5,9). La dernière étape est le séchage durant quinze secondes par pulvérisation de diazote. Les débits de solution sont alors de  $14 \pm 2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pour chacune des solutions de polycation et de polyanion. A titre d'exemple, la séquence utilisée pour la réalisation de films par pulvérisation simultanée est décrite figure 21. Le temps cumulé de pulvérisation est défini comme la somme des durées des étapes de pulvérisation.



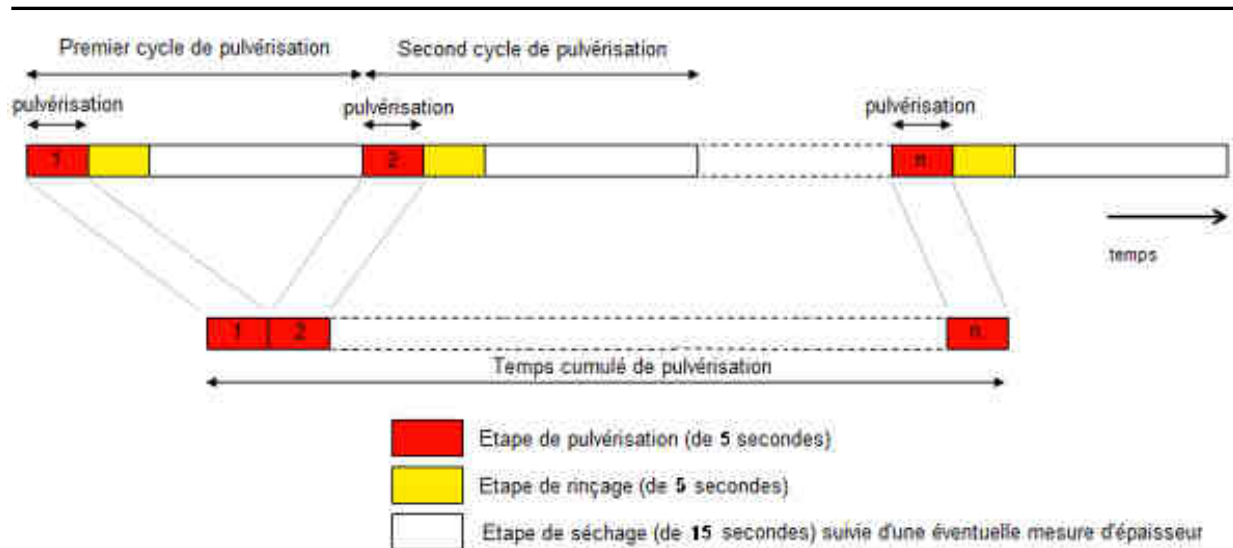


Figure 21 : Illustration de cycles successifs utilisés pour la construction de films dans le cas de la pulvérisation simultanée.

#### 2.4. Préparation des complexes

Les nanoparticules de polysaccharides sont formées par coacervation complexe, procédé qui repose sur la formation de complexes entre le chitosane et le polysaccharide anionique par interactions électrostatiques. Sauf indication contraire, 1 mL de solution de chitosane est ajouté à l'aide d'une seringue et d'une aiguille (0,80 \* 40 mm) dans 1 mL de la solution de polyanion. Le mélange est agité à 250 tr.min<sup>-1</sup> pendant 1 min puis filtré sur filtre Rotilabo® de 0,45 µm et placé dans une cuvette en polystyrène Plastibrand® pour effectuer une mesure de taille par diffusion de lumière avec un granulomètre NanoZS (Malvern Instrument).

### 3. Synthèses chimiques

#### 3.1. Synthétiseur de peptide

Les peptides sont synthétisés chimiquement à l'UMR 977 Inserm par M. Guerold, selon la stratégie Fmoc à l'aide d'un synthétiseur de Applied Biosystem (Foster City, USA). La méthode Fmoc est basée sur l'utilisation de groupements protecteurs orthogonaux, des

groupements protecteurs des chaînes latérales ou des agents de liaison à la résine. Durant la synthèse en phase solide, l'acide aminé en C-terminal du peptide d'intérêt doit être lié à un support insoluble via son groupement carboxylique. Puis, le groupement protecteur de la fonction amine est éliminé. Un excès du second acide aminé est introduit. Après le couplage, l'excès de réactif est éliminé par lavage et les groupements protecteurs sont éliminés de l'extrémité N-terminale du dipeptide, afin de permettre l'addition du troisième acide aminé. Ce processus est répété jusqu'à obtention de la séquence désirée.

### 3.2. Fonctionnalisation de l'acide hyaluronique

Dans ce travail de thèse, l'acide hyaluronique a été modifié pour y greffer le peptide cateslytine selon la méthode décrite par Wall et al. (Wall *et al.* 2008) (Schéma 1).

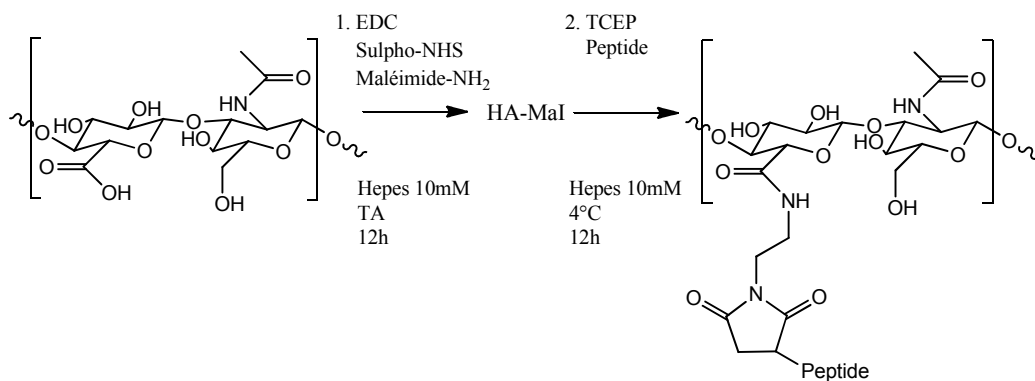


Schéma 1 : Schéma de synthèse général conduisant au HA modifié par le peptide cateslytine

Une première étape a consisté à modifier le HA par un groupement maléimide en présence d'EDC/NHS. Le HA-maléimide obtenu permet ensuite d'effectuer le couplage peptidique en y ajoutant le peptide ainsi que du tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). Le peptide a été synthétisé avec une cystéine en C terminal pour permettre le couplage (addition 1,4) entre le groupement thiol et le groupement maléimide.

### 3.2.1. Préparation de l'acide hyaluronique modifié par un groupement maléimide

La modification du HA par un groupement maléimide se déroule selon le Schéma 2.

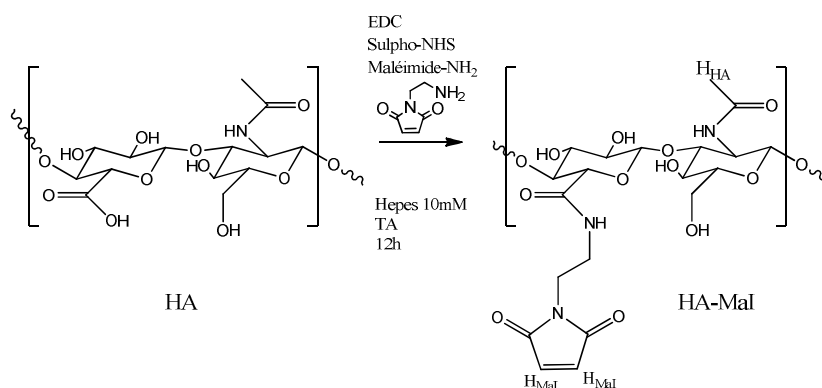


Schéma 2 : Schéma de la réaction de couplage du maléimide avec HA

Cette réaction se produit à température ambiante. L'acide hyaluronique (HA), (1 équivalent) est solubilisé dans une solution d'HEPES à 10 mM, pH 6. De l'EDC (0,7 équivalent) est ajouté à la solution, puis le sulfo-NHS (0,17 équivalent). Après 20 minutes, 0,19 équivalent de maléimide amine fourni par Sigma-Aldrich (réf.56951-250MG-F) est ajouté au milieu réactionnel. Le mélange est laissé ainsi sous agitation pendant 12h puis dialysé dans 0,5 M NaCl pendant 24h puis dans l'eau ultra pure Milli-Q® pour éliminer l'excès de groupement maléimide amine. Le produit est ensuite lyophilisé et analysé par RMN. Le taux de greffage est de 5% et le rendement de la réaction de 85%.

RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz,  $\delta$  (ppm):

Les déplacements chimiques des signaux correspondant aux protons sont écrits comme suit :  $\delta$  (x, W) où x est s (singulet), d (doublet), m (multiplet), l (large), W correspond à la molécule impliquée. Le tertibutanol est utilisé comme référence à 1,24 ppm dans  $\text{D}_2\text{O}$ .

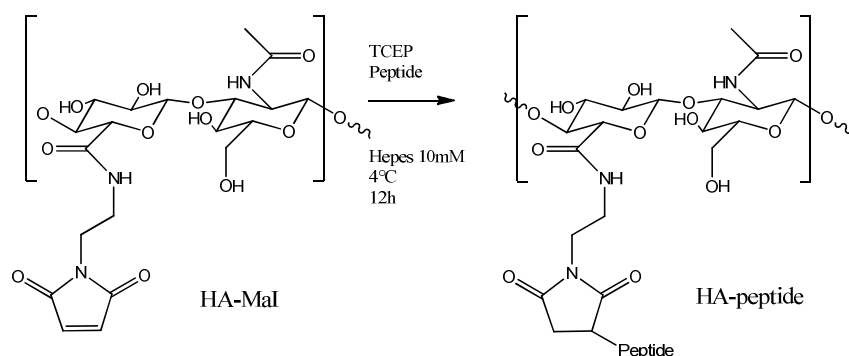
$\delta$  6,9 (s, maleimide), 4,5 (l d, HA), 3,5 (m), 2,0 (s, groupe acetyl de HA).

Sur le spectre du HA-Mal, la présence des pics 6,9 et 2,0 montrent bien le greffage du groupement maléimide sur HA.

Un contrôle a été réalisé en mettant en présence le HA et le maléimide-amine mais sans EDC et NHS. Dans ce cas, le pic de la contribution du Mal (1,94-2,04 ppm) disparaît. Le couplage ne se fait pas.

### 3.2.2. Greffage de la cateslytine sur l'acide hyaluronique

Après avoir activé l'acide hyaluronique avec le groupement maléimide, la réaction de greffage du peptide est réalisée (Schéma 3) :



1 équivalent de produit HA-Mal est solubilisé dans une solution tamponnée aqueuse (HEPES 10 mM, pH 6). 0,5 équivalent du peptide cateslytine est ajouté à la solution. Du TCEP est également ajouté à une concentration de 50  $\mu$ M. Le TCEP permet d'éviter la formation de pont disulfure entre les cystéines de la cateslytine et évite donc la formation de dimère. La réaction se poursuit pendant 12h à 4°C. La solution est ensuite dialysée avec 0,5 M NaCl pendant 24h puis de l'eau Milli-Q®. Le produit est enfin lyophilisé et analysé par RMN pour évaluer le taux de greffage. Le taux de greffage est de 5% et le rendement de la réaction est de 87%.

RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz,  $\delta$  (ppm):

7,35 (l s, acide aminé Ar de CTL), 7,25 (l s, acide aminé Ar de CTL), 7,10 (l s, acide aminé Ar de CTL), 6,85 (l s, acide aminé Ar de CTL), 4,50 (l s, HA), 4,40 (l s, CTL), 3,10 (l s, CTL), 2,50 (l s, CTL), 2,00 (s, methyl du groupe acetyl de HA), 1,75 (l s, CTL), 0,95 (l s, CTL).

Le pic des groupements maléimide n'est plus observé.

### 3.2.3. Synthèse de l'acide hyaluronique<sup>FITC</sup>-peptide

Le greffage de la fluorescéine isothiocyanate (FITC, Figure 22) sur le HA est réalisé par réaction de la fonction thiocyanate de la FITC avec une des fonctions hydroxyles de l'acide hyaluronique. Le couplage du fluorophore au polyélectrolyte est obtenu par formation d'une liaison isothio-urée qui implique le carbone électrophile du groupe isothiocyanate.

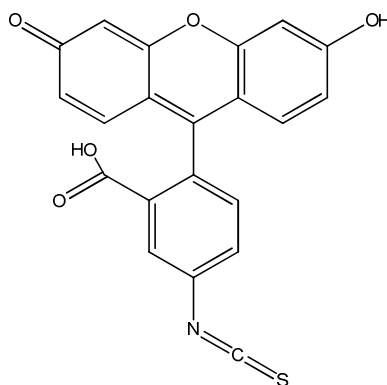


Figure 22 : Structure de la fluorescéine isothiocyanate FITC (excitation = 488 nm/ émission = 520 nm)

Le protocole de greffage est le suivant : 41  $\mu\text{mol}$  de la FITC sont dissoutes dans 2 mL de DMSO. Dans le même temps, une solution de HA-Mal de concentration 0,31  $\mu\text{mol}$  est préparée avec 18 mL d'eau ultra-pure. Les deux solutions sont mélangées et maintenues à pH 9 et laissées sous agitation durant 12 heures à température ambiante. 40 mL d'eau ultra-pure sont ajoutés au mélange avant de procéder à la dialyse de la solution finale. Le taux de greffage en FITC du HA<sup>FITC</sup>-Mal est de 0,01 %.

## 4. Méthodes de caractérisation et d'analyse physique

### 4.1. Ellipsométrie

L'ellipsométrie (Bernoux *et al.*) est une technique d'optique spéculaire. Elle permet la détermination rapide de l'épaisseur d'un film mince sur un substrat. Le principe de l'ellipsométrie est basé sur la polarisation de la lumière après réflexion (Figure 23). Une onde électromagnétique, produite par un laser, est polarisée d'abord rectilignement grâce à un polariseur puis est transformée en onde polarisée elliptiquement par une lame quart d'onde  $\lambda/4$ . La lumière est ensuite réfléchiée par la surface de l'échantillon à analyser. Après réflexion, cette onde passe par un analyseur et arrive sur le détecteur. Lors de la réflexion de la lumière sur l'échantillon, un déphasage est introduit entre les composantes de l'onde : la composante parallèle au plan d'incidence, notée  $p$  et la composante perpendiculaire, notée  $s$ . Ce déphasage modifie les paramètres de polarisation elliptique d'avant la réflexion sur l'échantillon.

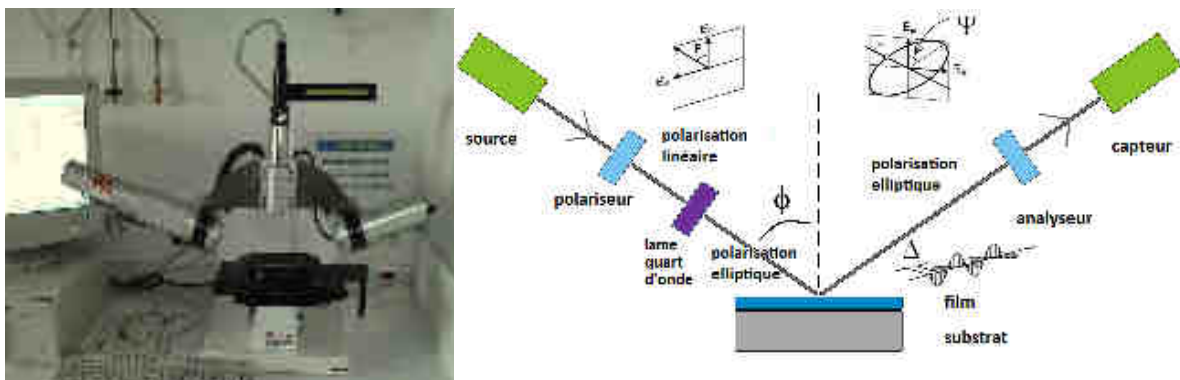


Figure 23 : photographie de l'ellipsomètre et illustration du principe de fonctionnement dans le plan d'incidence.

Dans le cas de l'ellipsomètre PLASMOS SD 2300, utilisé lors de cette étude, les positions du polariseur et de l'analyseur sont recherchées de manière à annuler le signal sur le détecteur. Ces deux positions angulaires sont directement reliées aux variables  $\Delta$  et  $\Psi$  qui sont définies comme suit :

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \tan(\Psi)e^{i\Delta} \quad (\text{II.1})$$

où  $r_p$  et  $r_s$  représentent les coefficients de réflectivité en amplitude des ondes polarisées respectivement parallèlement au plan d'incidence et perpendiculairement au plan d'incidence.

$\Psi$  et  $\Delta$ , mesurés par l'ellipsomètre sont ensuite convertis en épaisseur du film déposé sur le substrat, grâce à un modèle choisi préalablement. Pour nos études expérimentales, le modèle monocouche homogène et uniforme avec l'indice de réfraction fixé a été appliqué. L'ellipsomètre ne nécessite pas de calibration sur un échantillon de référence ou un faisceau de référence car il évalue la valeur d'un rapport ( $\rho$ ).

L'épaisseur mesurée est généralement comprise entre 0 et 200 nm. Lorsque la porosité ou la rugosité du film est de l'ordre de la longueur d'onde de la lumière d'analyse des incertitudes sur la mesure peuvent être obtenues. En effet dans ce cas, le film diffuse trop de lumière qui ne peut être réfléchi en direction du capteur. De même, lorsque le film est en réalité composé d'un dépôt de gouttelettes et ne forme pas un revêtement parfait, l'ellipsomètre fournira une valeur d'épaisseur d'un film théorique couvrant entièrement la surface (Figure 24). Ce cas est souvent observé au début de la construction des films lors des premières étapes de pulvérisation.

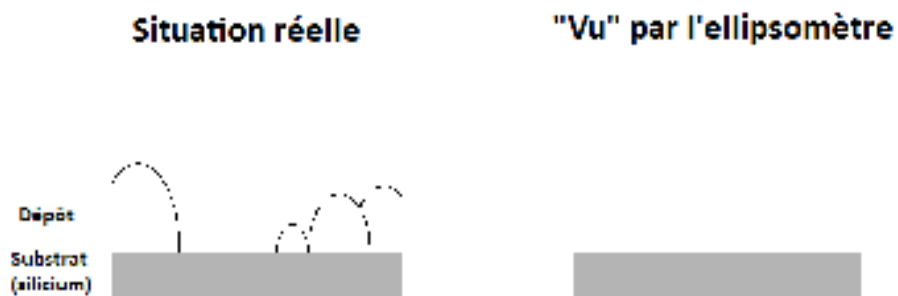


Figure 24 : Illustration des problèmes de mesure d'épaisseur par ellipsométrie d'un film inhomogène.

---

L'ellipsomètre PLASMOS SD 2300 utilisé est à longueur d'onde unique (632,8 nm) et à angle d'incidence fixe de 70°. L'indice de réfraction du dépôt est fixé à 1,465, valeur d'un dépôt de SiO<sub>2</sub>. Afin de s'assurer que ce choix d'indice de réfraction est valide, l'épaisseur des films a été également mesurée par microscopie à force atomique (AFM) en réalisant des rayures dans le film et par mesure du profil de la topographie de celles-ci. Pour chaque épaisseur mesurée, dix mesures ont été réalisées aléatoirement sur le film sur une surface de 1 cm<sup>2</sup> et moyennées.

#### 4.2. Microscopie à force atomique

Développée en 1986 par Binnig, Quate et Gerber (Rivoal and Frétigny ; Binnig and Quate 1986), cette technique s'inspire de la microscopie à effet tunnel. Cependant, contrairement à cette dernière la microscopie AFM permet d'imager des surfaces non conductrices à l'échelle du nanomètre.

La microscopie AFM est une technique de microscopie en champ proche qui permet d'accéder à la topographie de surface de l'échantillon. La surface est balayée, ligne par ligne, par une pointe en nitrure de silicium (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) très fine (rayon de courbure de 20 à 40 nm pour une pointe de contact), située à l'extrémité d'un microlevier de constante de raideur connue. Les mouvements mécaniques du microlevier sont convertis en signal électrique (Figure 25) grâce à la réflexion d'un faisceau laser qui frappe une diode à quadrants. Cette diode fournit une tension électrique proportionnelle à la déviation du faisceau, donc au changement de hauteur du microlevier. Un contrôleur électronique pilote le tube piézoélectrique porteur de l'échantillon à imager et permettant les mouvements en x, y, z par rapport à la pointe. La résolution latérale (x,y) est d'une dizaine de nanomètres, la résolution normale en z est de l'ordre de 0,1 nm.



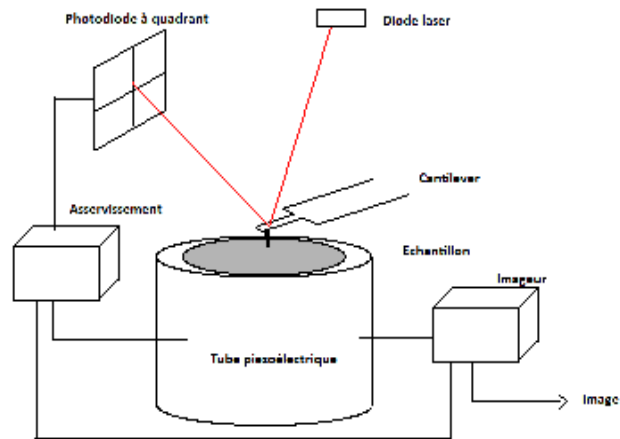


Figure 25 : Schéma de principe d'un microscope à force atomique (AFM).

Deux modes d'imagerie AFM peuvent être utilisés aussi bien sur un échantillon à sec qu'en milieu liquide :

- le mode contact où la pointe est en contact avec l'échantillon et balaye la surface en la touchant. Ce mode est utilisé pour les échantillons solides et durs, comme les puces en micro-électroniques (Figure 26).

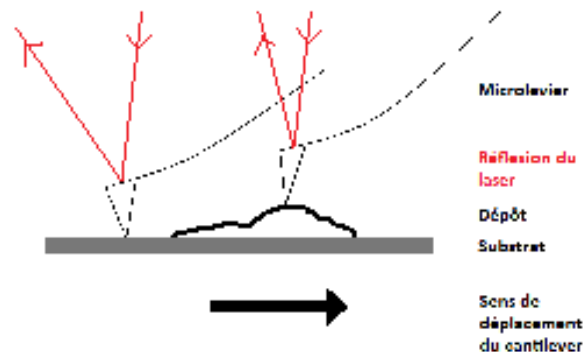


Figure 26 : Illustration de la microscopie à force atomique en mode contact.

- le mode tapping, la pointe oscille à sa fréquence de résonance et vient régulièrement à proximité de la surface de l'échantillon où les forces de van der Waals sont perceptibles et modifient la fréquence d'oscillation du microlevier. Sa fréquence d'oscillation étant maintenue fixe, le microlevier doit alors s'éloigner de la surface, grâce à la boucle d'asservissement. La pointe ne touche ainsi jamais la surface. Les pointes spécifiques au mode « tapping » permettent une grande résolution car elles

ont un rayon de courbure plus petit (inférieur à 10 nm) que celles utilisées en mode contact. Ce mode d'analyse est particulièrement indiqué pour les échantillons fragiles (Figure 27).

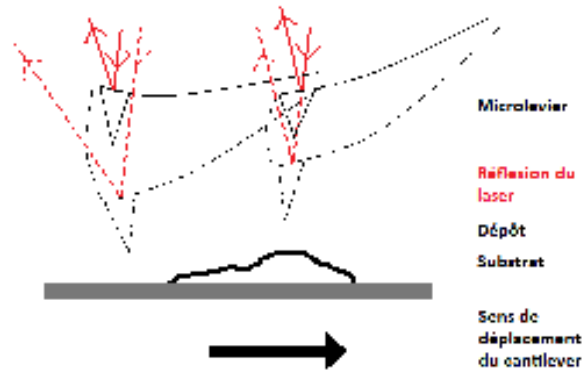


Figure 27 : Illustration de la microscopie à force atomique en mode tapping. Les pointillés correspondent au mouvement d'oscillation du microlevier.

Afin de mesurer par AFM l'épaisseur d'un film déposé, une rayure du film est effectuée jusqu'au substrat à l'aide d'un cône en plastique pour pipetman. En imageant la zone rayée, le profil de la rayure peut être enregistré et permet d'obtenir l'épaisseur du film (Figure 28).

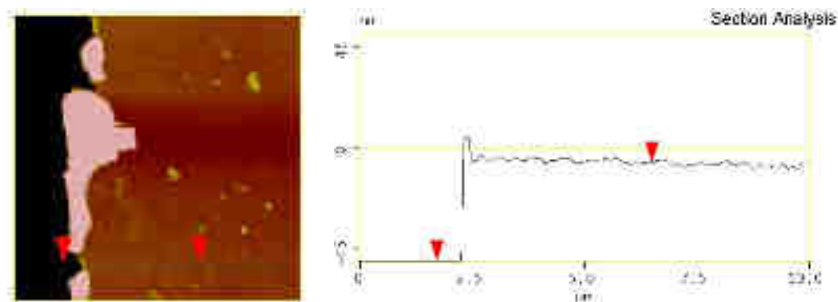


Figure 28 : Image AFM de  $10 \times 10 \mu\text{m}$  et section montrant la zone rayée permettant la mesure de l'épaisseur du film (différence de hauteur entre les deux flèches rouges). L'échelle en z est de 100 nm.

Toutes les images AFM ont été réalisées à l'aide d'un microscope AFM Veeco Multimode Nanoscope IIIA de Digital Instrument (Santa Barbara, USA). Dans le cas de films observés à sec, ces images ont été obtenues en mode contact avec des microleviers en nitrure de silicium de constante de raideur  $k_c = 0,6 \text{ N/m}$ . Dans le cas de films observés en liquide en mode Tapping ou PeakForce Tapping®, la constante de raideur est de  $k_c = 3 \text{ N/m}$ .

---

### 4.3. Microbalance à cristal de quartz

La microbalance à cristal de quartz avec dissipation, notée QCM-D (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation), a été utilisée afin de suivre in situ la construction des films de polyélectrolytes. Cette méthode permet de mesurer la masse déposée avec une précision de l'ordre du  $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Suivant les caractéristiques physiques du système étudié (viscosité du dépôt, nature du milieu), deux modèles mathématiques sont appliqués pour déterminer l'épaisseur du film déposé. Si le film est rigide, le modèle de Sauerbrey est appliqué. Dans le cas d'un film hydraté, le modèle viscoélastique de Voigt et Voinova est appliqué (Voinova *et al.* 1999).

#### 4.3.1. Principe général de fonctionnement de la QCM-D

Le principe de fonctionnement de la microbalance à cristal de quartz a été mis en équation et développé expérimentalement par G. Sauerbrey à partir de 1959 (Sauerbrey 1959). Cette technique repose sur les propriétés piézo-électriques du quartz : soumis à une différence de potentiels, le quartz se déforme et réciproquement, l'application d'une contrainte mécanique entraîne l'apparition d'une polarisation à ses bords.

Les substrats utilisés sont des cristaux de quartz revêtus de deux électrodes d'or, l'une d'entre elles pouvant être recouverte par une variété de revêtements conducteurs ou isolants. L'application d'une différence de potentiels entre ces deux électrodes induit un mouvement de cisaillement pur dans le cristal. En fixant la face inférieure du cristal, cette oscillation de cisaillement se traduira par une oscillation de translation horizontale. Le système se comporte alors comme un oscillateur harmonique qui peut être caractérisé par sa fréquence de résonance  $f_r$  :

$$f_r = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{M}} \quad (\text{II.2})$$

où  $M$  est la masse de l'oscillateur en kg et  $k$  sa constante de raideur. Lors d'un dépôt de masse  $m$  (kg) sur la surface du cristal, si  $m \ll M$ , la masse totale du résonateur change et une nouvelle fréquence de résonance  $f$  lui est associée :

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{M+m}} \approx f_r \left(1 - \frac{m}{2M}\right) \quad (\text{II.3})$$

La différence de fréquence de résonance induite par le dépôt de masse  $m$  sur le cristal s'écrit alors :

$$\Delta f = f - f_r = -\frac{mf_r}{2M} = -\frac{m}{C} \quad (\text{II.4})$$

où  $C$  est la constante caractéristique du cristal de quartz aussi appelée constante de Sauerbrey et définie telle que :

$$C = \frac{2M}{f_r} \quad (\text{II.5})$$

En mesurant la variation de la fréquence de résonance du système tout au long d'une expérience, la QCM-D donne accès à la masse déposée par unité de surface sur le cristal au cours du temps. Il est également possible de déterminer les fréquences de tous les harmoniques impairs de la fréquence de résonance fondamentale, et de suivre leurs variations respectives pendant une expérience. La relation de Sauerbrey devient alors :

$$m = C \frac{\Delta f_v}{\nu} \quad (\text{II.6})$$

où  $\nu$  est le numéro de l'harmonique considéré.

Cette relation est applicable à des dépôts en contact avec l'air et à des dépôts rigides et uniformes en milieu liquide (Sauerbrey 1959). L'utilisation de polymères très hydratés

conduit parfois à des assemblages se comportant de manière comparable à des liquides visqueux ou des gels. Dans ce cas, la relation de Sauerbrey n'est plus applicable. Un autre modèle, tenant compte des propriétés viscoélastiques du matériau déposé, doit alors être utilisé. Il s'agit du modèle de Voigt Voinova (Voinova *et al.* 1999).

Afin d'évaluer ces propriétés, la QCM-D permet l'acquisition pendant l'expérience du facteur de dissipation visqueuse (noté  $D$ ) du film. Ce paramètre est défini théoriquement par la proportion d'énergie perdue à chaque oscillation du cristal par rapport à l'énergie stockée dans l'oscillateur (relation II.7) (Hook *et al.* 1998).

$$D = \frac{E_{dissipé}}{2\pi \cdot E_{stocké}} \quad (II.7)$$

Le facteur de dissipation est expérimentalement accessible en excitant le cristal de quartz à sa fréquence fondamentale (ou celle d'un de ses harmoniques impairs) puis en mesurant le temps de relaxation du système à mesure que l'énergie du résonateur se dissipe dans le cristal, dans le dépôt et dans le milieu au contact du quartz (Figure 29). Ce temps de relaxation est inversement proportionnel à la constante d'amortissement du système qui permet de déterminer le facteur de dissipation  $D$  correspondant.

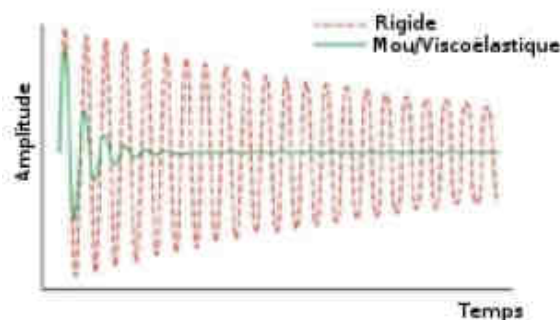


Figure 29 : Amplitude des oscillations du signal en fonction du temps pendant une expérience en QCM-D pour deux systèmes : l'un rigide (ligne rouge) et l'autre visqueux (ligne verte). Le cristal est d'abord excité à sa fréquence de résonance, puis l'amplitude du signal correspondant diminue à mesure que l'énergie du système est dissipée dans la lame de quartz, le film, et le milieu au contact. Lorsque le facteur de dissipation visqueuse  $D$  du dépôt augmente, le temps d'amortissement du signal diminue.

---

La dissipation mesurée par l'appareil renseigne sur les propriétés viscoélastiques du dépôt.

#### 4.3.2. Protocole expérimental

Les cristaux de quartz utilisés sont du type QSX 301 (fournis par Q-Sense) recouverts par une couche d'or de 100 nm. Ces cristaux possèdent une fréquence de résonance fondamentale à 5 MHz ainsi que des harmoniques impairs à 15, 25, 35 et 45 MHz.

La construction d'un film multicouche est réalisée dans la cellule de mesure de l'appareil QCM-D où se trouve le cristal de quartz. La température du thermostat interne de la cellule est définie à 25°C et la fréquence de résonance du cristal ainsi que ses harmoniques 3, 5, 7 et 9 sont suivies au cours du temps. Après stabilisation du signal de la solution tampon pendant 10 min de manière à obtenir une ligne de base stable, les solutions de polyélectrolytes sont alternativement mises au contact du cristal pendant 5 min en commençant par le polycation. Entre chaque injection de polyélectrolytes, une étape de rinçage est effectuée : la solution tampon est mise au contact du cristal pendant 5 min. Les variations des fréquences sont alors suivies en fonction du temps. Les étapes d'injection et de rinçage sont poursuivies jusqu'à obtenir le nombre de couches voulu. A la fin de l'expérience, le cristal est nettoyé *in situ*, avec une solution de Hellmanex à 2% pendant une demi-heure, puis rincé avec une solution de HCl 0,1 g.mol<sup>-1</sup>, lavé à l'eau Milli-Q® et séché à l'azote.

#### 4.4. Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière permet de mesurer la taille des particules dans une solution colloïdale. Son principe consiste en un faisceau laser He/Ne de longueur d'onde  $\lambda = 638$  nm, dirigé à l'aide de miroirs et focalisé avec différentes lentilles sur la cellule de

mesure contenant la solution à analyser. Le rayonnement diffusé est recueilli par le détecteur.

Le faisceau laser incident éclaire une particule en solution colloïdale. Deux faisceaux principaux en seront issus. Le faisceau transmis et le faisceau diffusé. Deux phénomènes peuvent être observés :

- si le diamètre de la particule est supérieur à  $\lambda/10$  alors la lumière diffusée aura une intensité différente en fonction de la direction. La diffusion est dite anisotrope.
- si le diamètre de la particule est inférieur à  $\lambda/10$ , alors la lumière diffusée aura une intensité identique dans toutes les directions. Dans ce cas la diffusion est alors isotrope. Cette condition correspond aux approximations de Raleigh-Debye et permet de simplifier la déduction des tailles.

Dans notre cas, les mesures de taille sont faites par rétrodiffusion à l'aide d'un granulomètre Zetasizer NanoZS (Malvern Instrument Ltd, Orsay, France). Le diamètre est calculé à partir de la fonction de corrélation de l'intensité de la lumière diffusée par les nanoparticules, assimilées à des sphères équivalentes. L'indice de polydispersité (PDI) correspond à la mesure de l'homogénéité de la dispersion, sa valeur est comprise entre 0 (dispersion homogène) et 1. Une valeur supérieure à 0,3 indique une large hétérogénéité.

#### *4.5. Microscopie à fluorescence*

La microscopie en fluorescence (Lichtman and Conchello 2005) est une technique de microscopie optique très utilisée en biologie. En plus de l'observation classique par réflexion et/ou absorption de la lumière visible, elle tire profit du phénomène de fluorescence. Un marqueur fluorescent (rhodamine, FITC...) est couplé à la molécule ou polyélectrolyte que

---

l'on souhaite observer (fluorescence secondaire). Soumis à une excitation lumineuse de longueur d'onde précise  $\lambda_1$ , généralement dans le domaine de l'ultraviolet, ce marqueur revient à son état fondamental par émission d'énergie sous forme lumineuse de longueur d'onde  $\lambda_2$ , avec  $\lambda_2 > \lambda_1$  (décalage de Stokes).

Au cours de cette thèse, les images de microscopie à fluorescence ont été réalisées avec un microscope à fluorescence inversé Nikon TE200.

## 5. Méthodes de caractérisation et d'analyse chimique

### 5.1. Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire

Au regard des spectroscopies classiques, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique assez récente et liée aux travaux de Bloch (Bloch 1946) et Purcell (Purcell *et al.* 1946) dans les années 40. Elle constitue actuellement la technique la plus puissante et la plus générale d'analyse structurale des composés organiques. Le principe de la RMN est relativement simple. La théorie est toutefois assez complexe (traitement mathématique et physique du phénomène lourd). La résonance magnétique nucléaire est un phénomène qui apparaît lorsque les noyaux de certains atomes, immergés dans un champ magnétique uniforme  $B_0$ , sont exposés à un autre champ magnétique variable  $B_e$ . Tous les noyaux ne répondent pas au signal. Cela dépend d'une de leur propriété : le spin nucléaire. Seuls les isotopes atomiques possédant un spin nucléaire sont sujets à des phénomènes de résonance magnétique nucléaire et pourront être étudiés en RMN. Son champ d'application s'étend à de nombreux domaines.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  ont été enregistrés à température ambiante sur le spectromètre Bruker Avance 400 MHz (Bruker BioSpin Rheinstetten, Allemagne). Tous les spectres ont été



---

réalisés dans l'eau lourde ( $D_2O$ ) contenant 5% de tertio-butanol. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au tertio-butanol ( $\delta = 1.24$  ppm pour les spectres de RMN  $^1H$ ).

### 5.2. *Chromatographie Liquide Haute Performance*

La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP ou HPLC) est une technique de séparation analytique. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange en fonction de l'hydrophobicité des composants.

Une phase mobile, parcourt une colonne, aussi appelée phase stationnaire. La réalisation de gradients d'élution à l'aide de différents solvants de diverses polarités est également possible. A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne. Grâce à ce phénomène de rétention, les constituants du mélange migrent tous à différentes vitesses. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. Au passage de chaque soluté séparé dans le temps, l'enregistreur décrit un pic différent de la ligne de base de la phase mobile. Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté du mélange injecté.

### 5.3. Séquenceur

Le séquenceur permet de déterminer la composition d'un peptide en utilisant la méthode récurrente d'Edman qui permet de déterminer la nature de l'acide aminé N-terminal de la chaîne. Celui-ci est intéressant car il possède un groupement amine (NH<sub>2</sub>) libre.

#### Méthode récurrente d'Edman (ou méthode des phénylthiohydantoïnes (PTH)):

L'échantillon peptidique est adsorbé sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) ou séché sur un disque en papier de fibre de verre imprégné d'un sel d'ammonium quaternaire polymérisé, le polybrène. Dans les deux cas, ce traitement permet l'immobilisation du peptide mais laisse pénétrer les réactifs de la dégradation d'Edman. La réaction se produit par étapes successives (Schéma 4).

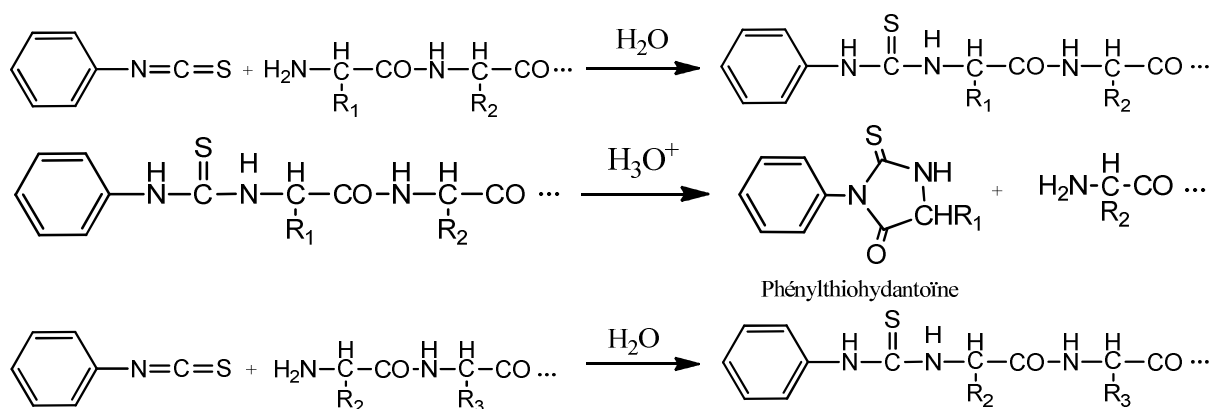


Schéma 4 : étapes de la méthode d'Edman pour la détermination de la séquence d'un peptide

Des quantités précises de réactifs (isothiocyanate de phényle), en solution ou sous forme de vapeurs entraînées par un courant d'argon, minimisant ainsi les pertes en peptide, sont ajoutées à intervalles programmés dans la cellule où a lieu la réaction. Il y a alors addition avec le groupe amine terminal (étape 1). Les thiazolinone-aminoacides sont ensuite enlevés automatiquement et hydrolysés en milieu acide (étape 2) pour être convertis en phénylthiohydantoïnes (PTH-aminoacides) correspondants et identifiés par HPLC

comparative. Le cycle recommence, l'isothiocyanate de phényle est additionné sur la chaîne peptidique n-1 acides aminés (étape 3) et ainsi de suite. La séquence d'acides aminés dans le peptide est ainsi déterminée. Les séquenceurs peuvent identifier un résidu à l'heure.

Généralement il est possible d'identifier entre 40 et 60 résidus depuis l'extrémité N-terminale d'un peptide (100 ou plus avec les appareils les plus performants) avant que les effets cumulatifs de réactions incomplètes, de réactions secondaires, et la perte de peptide rendent difficile l'identification d'acides aminés. Moins de 0,1 picomole de PTH-aminoacide peut être décelée et identifiée par un dispositif d'HPLC en phase inverse muni d'un détecteur UV. Il suffit donc d'une ou dix pico-moles d'un peptide pour en déterminer les cinq ou vingt-cinq premiers résidus du côté N-terminal (Voet and Voet 2004).

## *6. Méthodes biologiques*

### *6.1. Culture des fibroblastes gingivaux humains*

Les fibroblastes gingivaux proviennent de gencives de patients de la faculté de chirurgie dentaire dont le prélèvement a été fait au cours d'une extraction dentaire après consentement éclairé. Sous poste de sécurité microbiologique (PSM), les biopsies sont découpées en explants de 2 mm d'épaisseur environ, puis déposés dans des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup>, à raison d'une dizaine de fragments par flacon.

Chaque flacon de culture est ensuite placé à la verticale dans l'incubateur à 37°C sous une atmosphère humide composée de 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'air pendant 30 minutes afin de permettre l'adhésion de chaque explant au support plastique. Les explants sont ensuite recouverts d'une goutte de milieu de culture «Dublecco's Modified Eagle's Medium» (DMEM 1 g/L en glucose (Gibco), pénicilline-streptomycine (PS, Gibco) à 100 µg/mL et Fungizone à 2

µg/mL), contenant 20% de sérum de veau foetal (SVF, Gibco). Le milieu de culture est remplacé tous les trois jours par 5 mL de milieu DMEM 20% SVF par flacon de culture. Les fibroblastes vont ensuite migrer de l'explant et coloniser le flacon de culture en une dizaine de jours. Au bout de trois semaines, les explants et le milieu sont retirés. Les cellules sont alors récupérées et ensemencées dans des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup>. Cette étape constitue le premier passage, pour les passages suivants les cellules sont réensemencées dans des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup>.

A chaque passage les fibroblastes sont détachés par action de la trypsine. A confluence, les cellules sont lavées 3 fois avec 10 mL de PBS. Les cellules sont alors mises en contact avec 5 mL de solution Trypsine-EDTA (Gibco) et laissées à 37°C pendant 2-3 min jusqu'au détachement du tapis cellulaire. La digestion est ensuite arrêtée avec 10 mL de milieu complet (DMEM complété). La suspension cellulaire est recueillie dans des tubes à centrifuger de 50 mL, puis centrifugée à 1800 rpm pendant 3 minutes. Le culot est alors resuspendu dans du milieu complet, à raison de 15 mL par flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup> et les cellules sont mises en culture à 37°C.

Les cellules de fibroblastes gingivaux humains (FGH) utilisées pour cette étude sont entre le passage 6 et 10. Les cellules sont cultivées dans le milieu de culture « Duplecco's Modified Eagle's Medium » (DMEM, GibcoBRL) supplémenté avec 20% de sérum de veau foetal (SVF) et des antibiotiques (pénicilline-streptomycine à 100 µg/mL (Gibco) et Fungizone à 2 µg/mL). Les cellules sont placées dans une étuve thermostatée à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. Pour le passage, les cellules sont détachées en remplaçant le milieu de culture par de la trypsine (Trypsine/EDTA, Sigma à 0,5%) pendant 5 min à 37°C après rinçage par une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline). Si besoin, les cellules

sont stockées par congélation dans l'azote liquide. Pour la congélation, les cellules sont suspendues à  $10^6$  cellules/mL dans un milieu contenant du MEM, 20 % de sérum de veau fœtal (FCS Gibco) et 20% de dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma).

Pour les études de prolifération cellulaire, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre de 14 mm de diamètre, soit nues ou recouvertes par des films de polysaccharides, placées dans des plaques de culture 24 puits. Tous les supports sont préalablement exposés aux UV pendant 30 min. Les cellules sont déposées à une concentration de  $5 \times 10^4$  cellules par mL. La densité cellulaire est mesurée avec une technique de comptage sur cellule de numération de type Neubauer. Les cellules sont marquées au bleu de trypan (Gibco) pour faciliter le dénombrement des cellules viables. Le milieu de culture est changé après 24 heures, 3 jours et 5 jours.

### *6.2. Test de viabilité à AlamarBlue™ : Elisa*

Le suivi de la croissance cellulaire est réalisé grâce au test d'*AlamarBlue™* (Biosource International) qui mesure un indicateur du potentiel d'oxydoréduction des cellules viables. Le pourcentage de réduction du produit est détecté par dosage spectrophotométrique. Après un rinçage des cellules au PBS, une solution à 10% en *AlamarBlue™* (contenant du milieu DMEM sans rouge de phénol) est mise au contact des cellules pendant 4h à 37°C. Après 2 heures d'incubation,  $2 \times 150 \mu\text{L}$  sont prélevés dans chaque puits. Deux mesures d'absorbance sont effectuées à l'aide d'un lecteur Elisa Multiskan Ex (Thermo Electron Corporation), une à 570 nm et une autre à 630 nm. Une formule de calcul permet d'obtenir le pourcentage de réduction du produit :

$$AR_{LW} = [A_{LW} - (A_{HW} \times R_0)] \times 100 \quad (II.8)$$

où  $AR_{LW}$  est le pourcentage de réduction de l'AlamarBlue™,  $A_{LW}$  l'absorbance à 570 nm,  $A_{HW}$  l'absorbance à 630 nm et  $R_0 = A_{0LW}/A_{0HW}$  avec  $A_{0LW}$  la différence de l'absorbance à 570 nm du milieu avec AlamarBlue™ et l'absorbance à 570 nm du milieu seul et  $A_{0HW}$  la différence entre l'absorbance à 630 nm du milieu avec AlamarBlue™ et l'absorbance à 630 nm du milieu seul (Page *et al.* 1993; Voytik-Harbin *et al.* 1998).

### 6.3. Marquages immunofluorescents

L'immunocytochimie est une technique d'analyse des cellules par immunofluorescence qui permet de mettre en évidence des protéines exprimées par les cellules à l'aide d'un fluorochrome porté par un anticorps. Il s'agira ici d'immunofluorescence indirecte car le fluorochrome est porté par l'anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire. Les récepteurs exprimés à la surface des cellules (marqueurs cellulaires) sont reconnus spécifiquement par un anticorps (anticorps primaire). Afin de mettre en évidence la formation du complexe récepteur-anticorps primaire, un deuxième anticorps (anticorps secondaire) couplé à un fluorochrome, est utilisé. (Figure 30).

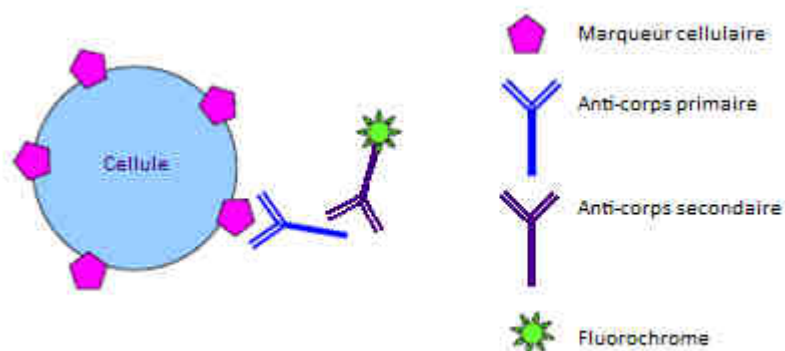


Figure 30 : Schéma illustrant le principe du marquage immunofluorescent indirect.

---

Protocole de marquage

Les cellules sont tout d'abord fixées au paraformaldéhyde (PFA) 3,7% pendant 15 min puis rincées trois fois au PBS pendant 5 min. La fixation permet d'immobiliser les antigènes de la cellule. Afin d'accéder à ces antigènes intracellulaires une étape de perméabilisation au PBS-Triton 0,25% est nécessaire pendant 10 min, suivie de trois rinçages au PBS. Pour saturer les sites non spécifiques les échantillons sont mis en contact d'une solution de PBS-BSA (Bovin Serum Albumin) 1% pendant 30 min. L'anticorps primaire, Anti-collagène de type I dans notre cas, est ensuite incubé pendant 2 heures à la concentration optimale de 1/200<sup>ème</sup> et à température ambiante. Après les 2 heures, trois rinçages au PBS de 5 min sont réalisés puis l'anticorps secondaire, Anti-Rabbit<sup>FITC</sup> est incubé à la concentration optimale de 1/1000, à la température ambiante et à l'obscurité, pendant 2 heures. Trois étapes de rinçage de 5 min au PBS suivent puis une solution de Phalloïdine-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Sigma) à 0,1 mg/mL diluée au 1/2000 est incubée 30 min. La phalloïdine est une toxine extraite de l'amanite phalloïde. Elle se lie à l'actine empêchant la dépoliarisation et empoisonnant la cellule. Cette propriété de liaison à l'actine lui permet d'être utilisée en imagerie cellulaire afin de visualiser l'actine. Après 3 rinçages au PBS, le DAPI (Sigma) à 50 ng/mL, marqueur nucléaire, est incubé pendant 1 min. Trois étapes de rinçage au PBS de 5 min terminent le protocole. Le montage des lames est alors possible à l'aide d'un milieu de montage pour fluorescence (Dako fluorescent mounting medium).

#### *6.4. Marquage des récepteurs membranaires CD44*

Les clusters de différenciation (CD) sont des antigènes exprimés par les populations cellulaires du système immunitaire et déterminent le type cellulaire et éventuellement leur fonction. Le CD44 est une glycoprotéine transmembranaire dont les fonctions sont

l'adhésion multispécifique et l'adhésion aux veinules post-capillaires en se liant au hyaluronate.

Pour notre étude, les films sontensemencés à une concentration cellulaire de  $1 \times 10^4$  cellules/mL. Au bout de 4h, 24h et 48h, les puits sont rincés deux fois au PBS à 37°C pendant 5 min. Les cellules sont incubées pendant une heure et demie à 37°C avec 300  $\mu$ L d'anticorps CD44 modifié avec le FITC dilué à 1/50<sup>ème</sup> dans une solution de BSA 0,5 % diluée dans le PBS. Après deux rinçages successifs de 5 min au PBS, les cellules sont fixées au PFA 3,7% à 37°C pendant 15 minutes. Les cellules sont rincées deux fois au PBS et les noyaux sont ensuite marqués au DAPI pendant 1 min puis rincés. Les lames sont alors montées à l'aide d'un milieu de montage pour fluorescence (Dako fluorescent mounting medium).

#### *6.5. Observation au microscope*

Après différents temps de culture, les cellules vivantes ont été directement observées dans des plaques 24 puits à l'aide d'un microscope inversé Nikon Eclipse TS100 pour une première étude morphologique. Les lames d'immunocytochimie sont ensuite observées avec un microscope inversé Nikon Eclipse TE200 en fluorescence et des images sont prises à l'aide d'une caméra reliée à ce microscope.



## Chapitre III Étude des complexes chitosane/acide hyaluronique

### 1. Introduction

La libération contrôlée de médicaments est principalement réalisée par encapsulation de principes actifs via la formation de particules. Dans notre groupe, de telles particules, de taille nanométrique, ont été développées par complexation directe d'un polyélectrolyte de charge opposée avec un peptide (le peptide P140) pour le traitement du lupus érythémateux ou une protéine (l'insuline) pour le traitement du diabète par voie orale (Frere *et al.* 2004). La libération du principe actif se fait alors par destruction des nanoparticules soit rapide (libération instantanée), soit lente (libération prolongée). Ces différentes libérations étant maîtrisées, la libération ultradienne est devenue le nouveau challenge. Il s'agit d'une libération du principe actif qui se fait par pic avec une fréquence régulière. Elle est utilisée dans l'organisme pour certains peptides et certaines protéines, notamment ceux réglant la prise alimentaire (sensation de faim ou de satiété). La synthèse de nanoparticules permettant de mimer cette libération de protéines pourrait être une façon de traiter un problème de santé publique reconnu comme majeur par l'Office Mondial de la Santé : le surpoids et l'obésité, deux états physiologiques qui augmentent les risques de maladies chroniques (cardio-vasculaire, diabète, certains cancers...). Les applications industrielles des complexes de polyélectrolytes existantes et potentielles sont nombreuses et ce domaine soulève encore beaucoup de questions fondamentales malgré les avancées des groupes de Kabanov (Kabanov *et al.* 2002; Kabanov *et al.* 2002b) ou Dubin (Gao *et al.* 1998; Seyrek *et al.* 2003).

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence l'influence de différents paramètres sur la formation des complexes de polysaccharides.

Nous avons étudié principalement l'influence des conditions de préparation sur leurs caractéristiques physico-chimiques ainsi que leur stabilité dans le temps. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au développement de nanoparticules construites étape par étape. Dans l'idéal, les nanoparticules doivent être formées par des dépôts successifs de couches de principe actif et de couches barrières sur un noyau de complexe de polyélectrolytes obtenu par coacervation complexe, les couches barrières servant à empêcher le principe actif de diffuser dans toute la nanoparticule (Figure 31 a). La stratégie appliquée est basée sur l'utilisation d'alternance de films multicouches à croissance exponentielle (diffusifs pour le principe actif) et de films à croissance linéaire (barrière au principe actif) (Garza *et al.* 2004).

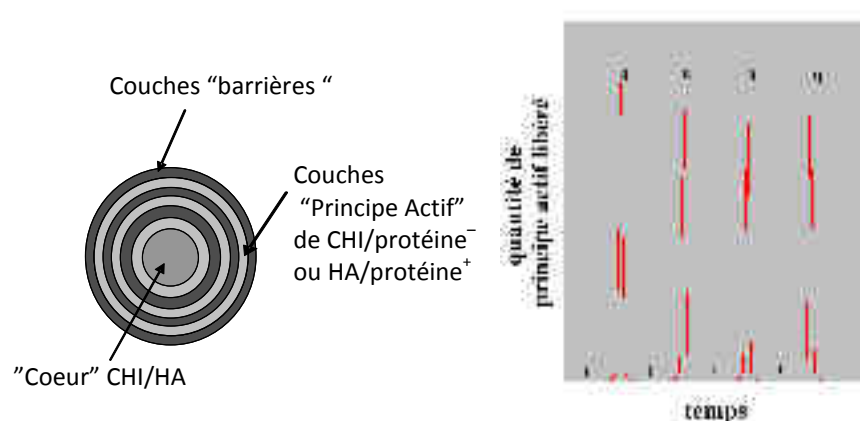


Figure 31 : (a) Schéma d'une nanoparticule multicouche et (b) principe de libération ultradienne d'un principe actif

L'épaisseur de chaque couche permettra de régler la quantité de principe actif libéré et le temps entre deux pics de libération successifs. La dissolution des nanoparticules au contact du milieu physiologique pourra se faire soit par hydrolyse, soit par dégradation enzymatique, de l'extérieur vers l'intérieur de la capsule. Les dissolutions successives des deux types de films permettront la libération des principes actifs par pics (Figure 31 b). Dans un premier temps, des complexes CHI/HA ont été préparés par coacervation complexe et étudiés en faisant varier plusieurs paramètres. Dans un second temps, les complexes

obtenus, de diamètre environ 200 nm, ont servi de cœur pour obtenir des nanoparticules par adsorption successives de couches de CHI et de HA.

## *2. Influence des paramètres de préparation des complexes*

### *2.1. Solutions de polysaccharides et préparation des complexes*

Dans cette étude, nous avons utilisé du CHI Protasan UP B 80/20 de degré de déacétylation 84 % et de masse molaire 200 000 g/mol fourni par Novamatrix (CHI<sub>200</sub>) et du HA fourni par Lifecore Biomedical de masse molaire 420 000 (HA<sub>420</sub>) ou 1 000 000 g/mol (HA<sub>1000</sub>). Les solutions ont été préparées, sauf mention contraire, à une concentration de 0,3 mg/mL, dans HCl  $2 \times 10^{-3}$  M pour le CHI et à 0,9 mg/mL dans l'eau pour le HA sans ajuster les pH. Les complexes ont été obtenus par ajout en une seule fois, à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de  $0,8 \times 40$  mm, de la solution de CHI dans celle de HA sous agitation (250 tr.min<sup>-1</sup>) maintenue pendant un temps défini à température ambiante. Le rapport molaire de charges du mélange de ces solutions est de 1,57, HA est donc en excès. Après filtration sur filtre Millipore Rotilabo® à 0,45 µm, la solution colloïdale a été analysée par diffusion dynamique de la lumière pour mesurer la taille des particules ainsi que par électrophorèse pour mesurer leur potentiel Zêta grâce à un Zetasizer Nano ZS (Malvern, U.K.). Les mesures de taille ont été effectuées à 25°C avec un angle de 173°.

### *2.2. Temps d'agitation*

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence du temps d'agitation lors de la préparation des complexes à différents taux de sel (Figure 32 a et b). Pour un même temps d'agitation, la taille des complexes augmente avec l'augmentation du taux de sel quelque soit le HA utilisé avec une augmentation plus forte pour CHI<sub>200</sub>/HA<sub>420</sub> que pour CHI<sub>200</sub>/HA<sub>1000</sub>.

Les interactions entre CHI et HA seraient plus importantes lorsque ce dernier possède une plus grande longueur de chaîne formant des complexes moins sensibles au changement de concentration saline. Une légère augmentation de taille des complexes est obtenue avec l'augmentation du temps d'agitation. Elle est plus marquée pour les couples CHI<sub>200</sub>/HA<sub>1000</sub> à 40 h d'agitation. Le temps d'agitation n'a que peu d'influence sur la taille des complexes pendant les deux premières heures. Par la suite, le temps d'agitation a été fixé à 15 min.

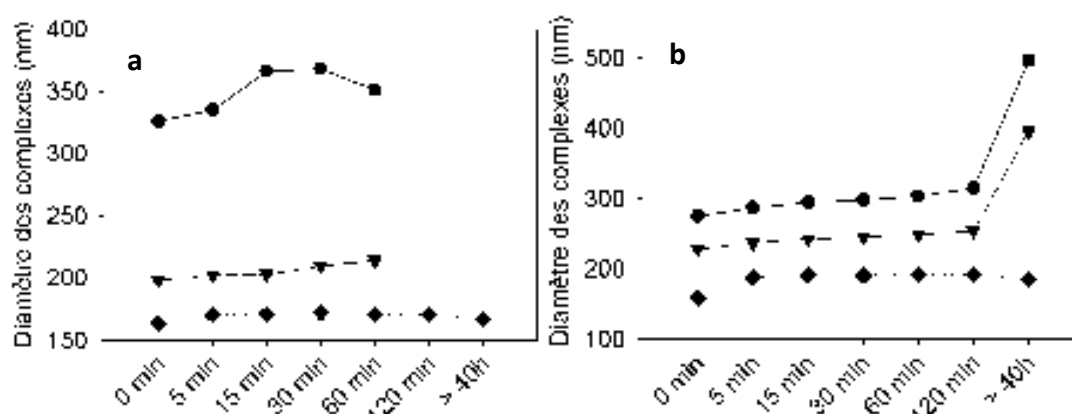


Figure 32 : Evolution de la taille des complexes (a) CHI<sub>200</sub>/HA<sub>420</sub> et (b) CHI<sub>200</sub>/HA<sub>1000</sub> (●) obtenus à 0,15 M NaCl, (▼) obtenus à 0,01 M NaCl et (◆) obtenus à 0 M NaCl en fonction du temps d'agitation

### 2.3. Taux de sel et stabilité dans le temps

La stabilité dans le temps des complexes CHI/HA a également été étudiée (Figure 33). Après formation des complexes suivant le protocole décrit précédemment, leur taille a été mesurée immédiatement après préparation puis à différents intervalles de temps. Entre les mesures, les solutions de complexes ont été conservées à 4°C puis remises à température ambiante 30 min avant mesure de leur taille. Pour des taux de sel de 0 à 0,01 M NaCl, les complexes sont stables dans le temps jusqu'à au moins 28 jours quelque soit la taille de l'acide hyaluronique utilisé. Lorsque le taux de sel est de 0,15 M NaCl une fluctuation du diamètre des complexes est observée, plus importante dans le cas de CHI/HA<sub>420</sub>. Ceci est probablement dû à l'écrantage des charges des polysaccharides par les ions du sel et à une réorganisation au sein des complexes et de la solution.

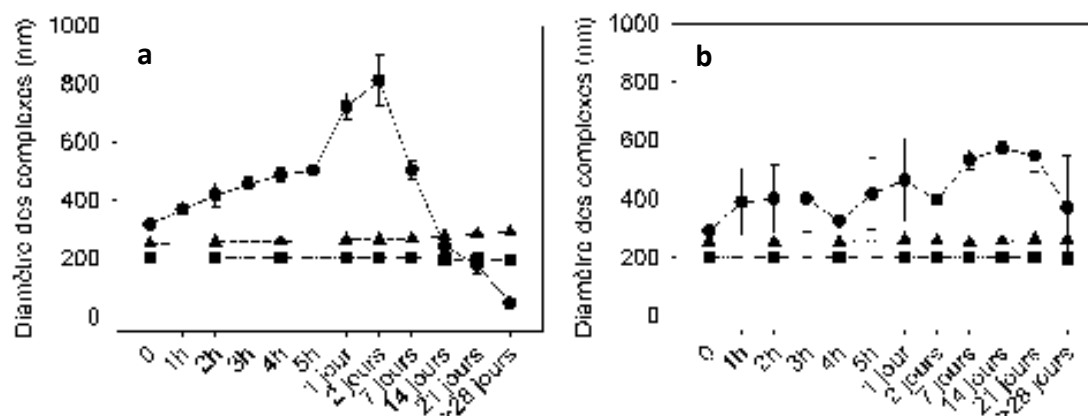


Figure 33 : Evolution de la taille pour différents taux de sel des complexes (a) CHI<sub>200</sub>/HA<sub>420</sub> et (b) CHI<sub>200</sub>/HA<sub>1000</sub> obtenus (●) à 0,15 M NaCl, (▲) à 0,01 M NaCl et (■) à 0 M NaCl en fonction du temps de stockage.

Des images des complexes ont été réalisées par microscopie électronique en transmission. Après marquage à l'acétate d'uranyle, les complexes ont été imagés à 75 kV (Figure 34). Des nanoparticules sphériques ont été observées, de diamètre inférieur à 100 nm. La différence de diamètre entre les résultats obtenus par diffusion de la lumière et microscopie est due, d'une part à l'ultravide nécessaire à la microscopie électronique en transmission qui « dessèche » les complexes, d'autre part à la définition du diamètre dans chaque technique. En effet par diffusion de lumière, le diamètre mesuré est le diamètre hydrodynamique qui comprend à la fois la taille des complexes mais aussi l'épaisseur de la couche de solvation alors que la microscopie électronique en transmission permet de mesurer le diamètre « optique » des complexes « secs ».

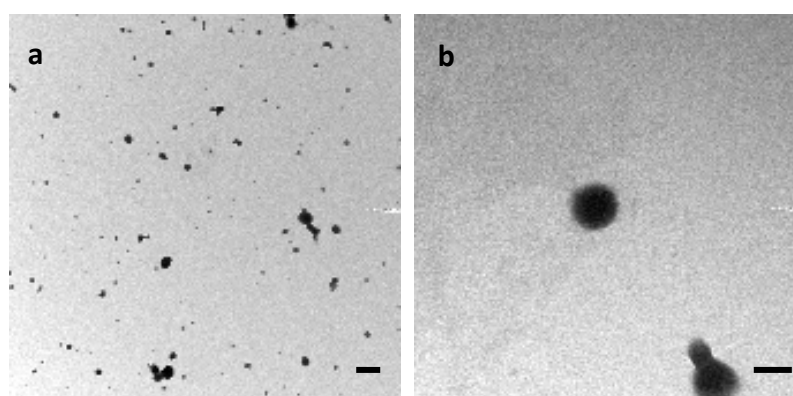


Figure 34 : Images de microscopie électronique en transmission de nanoparticules de CHI<sub>200</sub>/HA<sub>420</sub> à 0,01 M NaCl prises à 75 kV. La barre d'échelle représente (a) 500 nm et (b) 100 nm.

## 2.4. Purification des complexes

La purification des complexes formés est nécessaire pour supprimer les chaînes libres de polysaccharides en excès, ici HA. Différentes techniques de purification existe. Dans notre étude nous nous sommes penchés sur la purification par centrifugation et la purification sur colonne Sephadex G-25 (GE Healthcare, France).

### 2.4.1. Purification par centrifugation

Les travaux de Na Wang dans le cadre de son stage master II au sein du laboratoire ont montré que les paramètres de la centrifugation avaient une influence sur le diamètre des complexes et qu'il existait des paramètres optimums pour chaque couple de polyélectrolytes utilisés. Nous avons fait varier deux paramètres lors de la centrifugation : la vitesse et le temps. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2). Le diamètre des complexes augmente après centrifugation quelque soit le temps et la vitesse de celle-ci. Plus le taux de sel est élevé, plus le diamètre des complexes augmente, comme trouvé précédemment, l'augmentation après centrifugation étant plus marquée. Il en est de même pour l'indice de polydispersité (Pdl) qui mesure l'étalement de la distribution granulométrique.

Tableau 2 : Diamètre des complexes CHI<sub>200</sub>/HA<sub>420</sub> mesuré par diffusion de lumière en fonction du taux de sel et des paramètres de la centrifugation.

[NaCl] (M)	Vitesse de centrifugation		Temps de centrifugation (min)	Avant centrifugation		Après centrifugation	
	(tr/min)	(g)		Diamètre (nm)	Pdl	Diamètre (nm)	Pdl
0	4000	1520	40	180	0,182	211	0,251
0	5000	2370	30	182	0,218	189	0,088
0,01				213	0,096	317	0,142
0,15				396	0,157	488	0,513

Des mesures de taille sur le surnageant nous ont permis de constater que tous les complexes n'étaient pas récupérés. Cependant en augmentant le temps de centrifugation ou la vitesse, les difficultés de redispersion du culot augmentent : même au bout d'une semaine, les échantillons ne sont pas redispersés. Une autre méthode a donc été testée pour permettre la purification des complexes.

#### 2.4.2. Purification sur colonne Sephadex

Des complexes CHI<sub>200</sub>/HA<sub>420</sub> dans 0,15 M NaCl ont été préparés selon le protocole décrit précédemment puis filtrés sur colonne Sephadex pour supprimer les chaînes libres de HA. Deux méthodes existent, soit par gravité, soit par centrifugation à 1000 g pendant 2 min. Les résultats obtenus sont les suivants :

Tableau 3 : Mesure de la taille des complexes CHI<sub>200</sub>/HA<sub>420</sub> préparés dans 0,15 M avant et après purification par Sephadex selon deux méthodes

	CHI <sub>200</sub> /HA <sub>420</sub>	
Diamètre des complexes avant purification (nm)	333	306
Diamètre après purification par gravité	553	/
Diamètre après purification par centrifugation	/	355

Quelque soit la méthode utilisée, le diamètre des complexes augmente de manière significative en particulier par la méthode par gravité. Nous avons donc choisi de purifier les complexes par colonne Sephadex par centrifugation afin d'obtenir le cœur CHI/HA pour la suite de l'étude.

### 3. *Multicouches sur complexes de chitosane/acide hyaluronique*

Après avoir étudié les paramètres influençant la formation des complexes CHI/HA et défini le protocole de préparation, nous avons essayé de déposer des couches sur les complexes formés. Le protocole de préparation suivant a été appliqué : 1 mL à 0,01 M NaCl de solution de CHI<sub>200</sub> à 0,3 mg/mL a été ajouté à 1 mL de solution de HA à 0,9 mg/mL sous agitation (250 tr/min) pendant 15 min. Les complexes ont été filtrés sur filtre Rotilabo® de 0,45 µm. Après formation de ces complexes qui formeront le cœur de la particule, une filtration sur colonne Sephadex a été réalisée. Après conditionnement de la colonne Sephadex, les complexes ont été filtrés par centrifugation à 1000 g pendant 2 min. Cette étape a été reproduite après chaque ajout de couche supplémentaire déposée pour éliminer les chaînes libres de polysaccharides. Les couches supplémentaires ont été ajoutées selon le même principe que la formation du cœur à 0,01 M NaCl.

Dans un premier temps, la construction du film CHI/HA à 0,01 M NaCl a été suivie par microbalance à cristal de quartz. L'opposé de fréquence normalisée de la troisième harmonique augmente après chaque dépôt de CHI et reste stable lors du dépôt de HA (Figure 35). La construction du film CHI/HA est linéaire. Dans un deuxième temps, des couches de CHI et HA à 0,01 M NaCl ont été construites sur les complexes de CHI/HA. Les complexes CHI/HA (le cœur) ont un diamètre d'environ 200 nm et sont chargés négativement. Des mesures de taille (Figure 36 a) et de potentiel Zêta (Figure 36 b) ont été effectuées après chaque couche déposée. Après l'ajout de la première couche de chitosane, une augmentation de la taille des particules est observée suivi par une diminution avec l'ajout de la couche de HA. Puis la taille se stabilise et n'évolue plus avec l'ajout des couches



suivantes. En parallèle, une alternance de la charge de surface est obtenue après chaque ajout de couche (Figure 36 b)

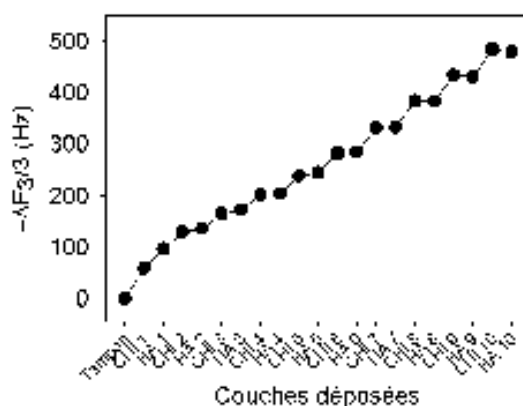


Figure 35 : Evolution de l'opposée de la fréquence normalisée de la troisième harmonique, mesurée par microbalance à cristal de quartz, en fonction de la couche dernière déposée lors de la construction des films de CHI<sub>200</sub>/HA<sub>420</sub> à 0,01 M NaCl

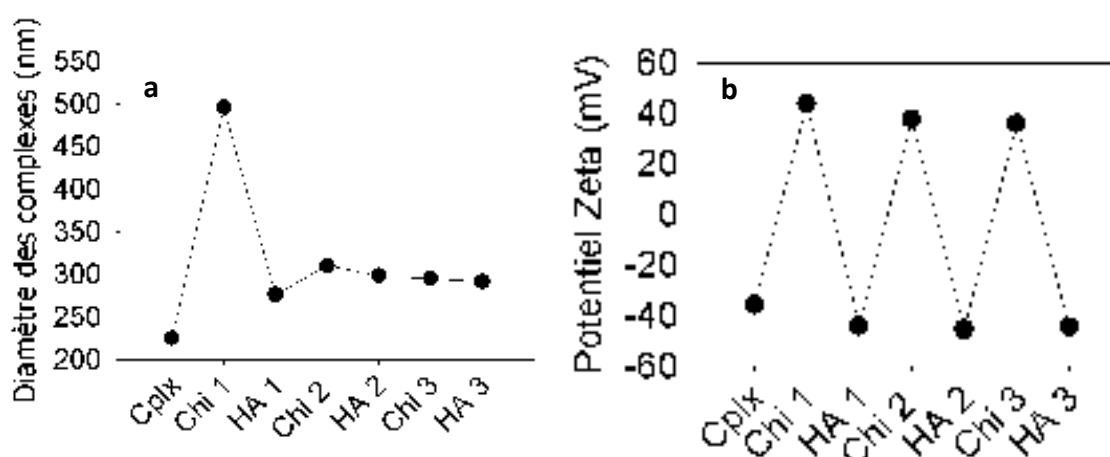


Figure 36 : Evolution (a) de la taille des complexes et (b) du potentiel Zeta des complexes CHI<sub>200</sub>/HA<sub>420</sub> préparés à 0,01 M NaCl au cours du dépôt de polysaccharides CHI et HA.

Deux hypothèses sont envisagées : la dernière couche déposée enlève de la matière du complexe et ne permet pas la formation de couche sur le cœur de CHI/HA. Ainsi, à chaque addition de polysaccharides, de nouveaux complexes de même taille seraient formés à partir de ceux existant déjà en solution. Une autre raison pourrait être liée aux paramètres de préparation de ces nanoparticules. En effet, Díez-Pascual et al. ont réussi à déposer des multicouches de PLL/PGA et de CHI/dextran sulfate (DEX) sur des billes de gel thermosensible de poly(N-isopropylacrylamide-co-acide methacrylique) pNIPAM-co-MAA

(Diez-Pascual and Wong 2010). Ils ont montré qu'il existait bien une inversion de charge après chaque dépôt. Après une diminution du diamètre avec le premier dépôt, la construction se poursuit normalement. Leur temps de contact entre les complexes et la solution de la couche à déposer est différent de celui utilisé dans notre cas : 4 à 6 h dans leur cas. De même une purification par centrifugation et redispersion des nanoparticules a été effectuée, ce que nous n'avons pas fait pour cause de non redispersion dans notre cas.

Pour stabiliser le cœur complexe CHI/HA, nous avons donc réticulé les polysaccharides avec EDC/NHS selon deux protocoles avant de déposer les multicouches.

- Réticulation post préparation : dans un premier temps, les complexes ont été formés selon le protocole décrit plus haut puis purifiés sur colonne Sephadex par centrifugation à 1000 g pendant 2 min. Dans un second temps, la réticulation s'est déroulée à 4°C pendant 24h par ajout de 0,5 mL d'une solution d'EDC à 5,5 mg/mL et 0,5 mL d'une solution de NHS à 22 mg/mL dans 1 mL de solution de complexes (courbe ● Figure 37).
  
- Réticulation pendant la préparation : les complexes ont été formés à 4°C pendant 24h par ajout de 0,5 mL de la solution de CHI à 0,3 mg/mL dans 0,5 mL d'une solution de HA à 0,9 mg/mL dans laquelle ont été préalablement ajoutés 0,5 mL d'une solution d'EDC à 5,5 mg/mL et 0,5 mL d'une solution de NHS à 22 mg/mL (courbe ▲ Figure 37).

Pour vérifier leur bonne réticulation, les complexes ont été introduits dans une solution de 1 M NaCl puis une mesure par diffusion de lumière a été effectuée. En effet, les complexes CHI/HA non réticulés sont détruits dans une solution de 1 M NaCl. Malgré une légère augmentation de la taille des complexes réticulés après 15 min dans NaCl 1M, ils

présentent une polydispersité  $< 0,2$  et donc considérés comme monodisperses. La réticulation permet bien de maintenir la cohésion des complexes lors de l'augmentation du taux de sel du milieu.

Les multicouches ont été déposées sur les particules réticulées comme décrit précédemment. Une mesure du diamètre des nanoparticules obtenues a été réalisée après réticulation et après chaque étape d'adsorption des couches. Après réticulation, le diamètre des particules augmente de 250 nm à 370 nm. Les complexes réticulés lors de leur préparation ont un diamètre plus faible de 320 nm. Le stockage des particules pendant 6 jours induit une légère augmentation de leur taille (Figure 37). Après ajout des deux premières couches, i.e. CHI puis HA, le diamètre des particules diminue très fortement passant de près de 400 nm à 200 nm lors de l'ajout de la couche de HA. La construction de multicouches semble impossible.

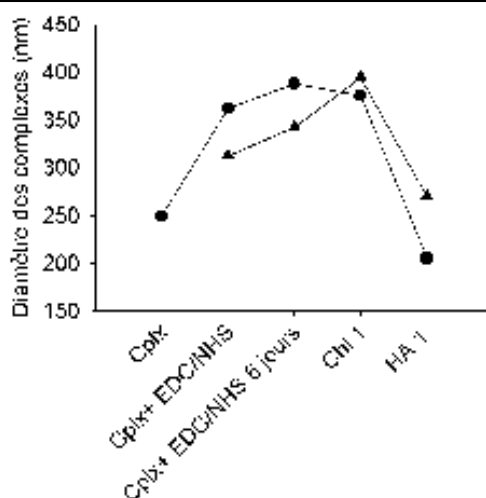


Figure 37 : Evolution de la taille des complexes CHI<sub>200</sub>/HA<sub>420</sub> à 0,01 M NaCl avec la réticulation et le dépôt de couches de polysaccharides (●) la réticulation ayant lieu après la formation des complexes et (▲) la formation des complexes ayant lieu en même temps que la réticulation.

#### 4. Conclusion

Nous avons construit des complexes qui serviraient de cœur à des nanoparticules multicouches permettant la libération ultradienne. Différents paramètres pour la préparation des complexes CHI/HA ont été étudiés. Le temps d'agitation lors de la préparation de ces complexes n'a que peu d'influence sur leur taille jusqu'à 2h après l'ajout de la solution de chitosane dans celle d'acide hyaluronique. Ces complexes sont stables dans le temps lorsque la concentration en sel est inférieure ou égale à 0,01M NaCl. La purification des complexes pour éliminer les chaînes de polysaccharides en excès induit une augmentation du diamètre des complexes. La purification par colonne Sephadex avec centrifugation limite ce phénomène. Malgré la réticulation du cœur des nanoparticules, la construction de multicouches sur les complexes CHI/HA dans notre cas, n'a pas été possible. Afin de mieux cerner et d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes de formation des couches, nous nous sommes tournés vers l'étude des films de polysaccharides construits par pulvérisation alternée et simultanée.

### 5. Complément d'étude : Influence du pH du milieu environnant sur le cœur CHI/HA

Nous nous sommes intéressés à l'influence du pH du milieu environnant sur la taille des complexes préalablement formés à pH 4. La taille des complexes a été mesurée en fonction du pH par titration (Figure 38). Une solution de sel de chlorure de chitosane (Protasan Cl 230, Novamatrix) à 0,3 mg/mL dans 150 mM NaCl pH 4 est ajoutée à une solution d'acide hyaluronique à 0,3 mg/mL dans 150 mM NaCl pH 4, soit un rapport molaire de 0,62. Les complexes ont été filtrés comme précédemment. Pour ces résultats la fonction titration du Zetasizer Nano ZS par NaOH et HCl à 0,1 M, a été utilisée pour modifier le pH du milieu entre chaque mesure de taille. Pour un pH compris entre 3,5 et 5,5 environ, le diamètre des complexes est stable. Lorsque le pH se situe en dessous ou au dessus de ces valeurs, une forte augmentation du diamètre est observée.

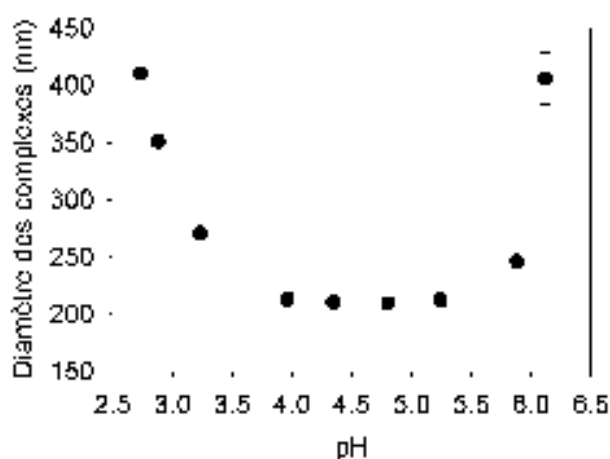


Figure 38 : Evolution du diamètre des complexes CHI/HA<sub>420</sub> mesuré par diffusion de lumière en fonction du pH du milieu

Le potentiel Zêta a également été mesuré en fonction du pH du milieu (Figure 39). Dans les conditions de formation des complexes décrites ci-dessus, ce potentiel est positif, il y a donc un excès de chitosane, ce qui est en accord avec le rapport molaire de charge.

Lorsque le pH passe au dessus de 5,5, le potentiel Zêta chute jusqu'à devenir négatif (charge du HA).

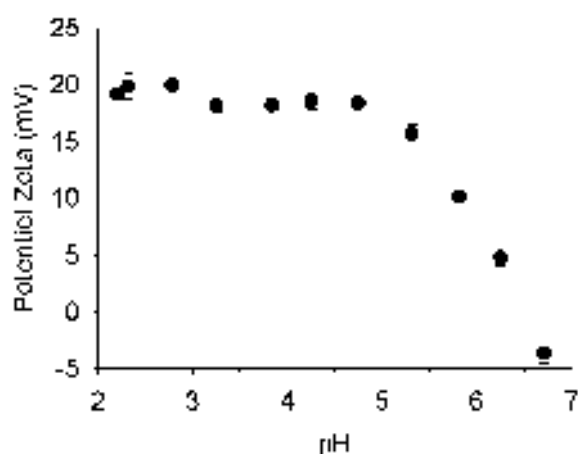


Figure 39 : Evolution du potentiel Zêta des complexes CHI/HA<sub>420</sub> en fonction du pH du milieu

Pour des pH respectivement supérieurs au pKa du chitosane (~6,5) (Strand *et al.* 2001) et inférieurs à celui du HA (~2,9) (Lapcik *et al.* 1998), les groupements amines du chitosane sont moins protonés et les groupements carboxyliques du HA sont moins déprotonés. Le restant des groupes protonés pour le chitosane et déprotonés pour HA disponibles pour les interactions sera moins important, il en résulte une diminution de la force des interactions électrostatiques qui conduit aux changements observés sur la taille et le potentiel Zêta. Des comportements similaires ont été observés pour des complexes chitosane/alginate (Saether *et al.* 2008) obtenus de la même manière que dans notre cas ou par gelation (Douglas and Tabrizian 2005), ce qui suggère que les interactions les plus fortes entre les polymères ont cours lorsque le plus de groupements latéraux sont chargés (Figure 40).

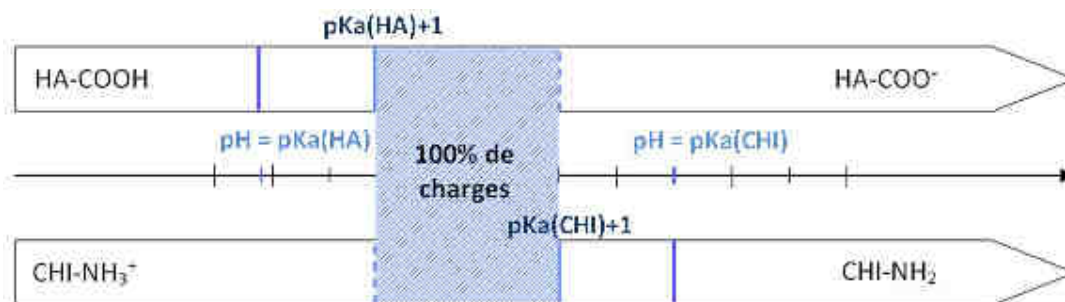


Figure 40 : Evolution des charges de polysaccharides en fonction du pH du milieu

Les problèmes rencontrés lors de cette étude nous ont contraints à nous tourner vers la construction de films de polysaccharides en 2D. Dans le chapitre suivant nous développons la construction de films de polysaccharides par pulvérisation.

## Chapitre IV Construction de films de polysaccharides par pulvérisation simultanée ou alternée

### 1. Introduction

N.B : Les numéros de figures ainsi que les numéros de références renvoient à une numérotation indépendante du reste du manuscrit. Ils correspondent à ceux publiés dans la revue Langmuir.

Nous avons vu dans le chapitre I que Lefort *et al.* (Porcel *et al.* 2005) ont montré que l'on pouvait construire des films formés de complexes de polyélectrolytes synthétiques en pulvérisant simultanément des solutions de polycations et de polyanions sur un support maintenu verticalement. Différents systèmes synthétiques ont été testés, en particulier le système PAH/PSS, très étudié dans le domaine des multicouches de polyélectrolytes. Il a été montré que l'épaisseur des films, quelque soit le système étudié, augmentait linéairement en fonction du temps cumulé de pulvérisation. De plus, la vitesse de construction des films varie en fonction du rapport des flux de pulvérisation polyanion/polycation (en équivalent monomères). Une valeur optimale de ce rapport correspondant à une vitesse maximale de construction du film a été systématiquement observée aux alentours de 1. Les morphologies des films sont de deux types : granulaire comme les films PAH/PSS, rugueux et constitués de grains dont la taille semble être corrélée à la cinétique de croissance du film, ou lisse comme le système PDADMAC/PAA à pH 7,5. Des analyses XPS sur le système PAH/PSS ont montré que la composition des films est de 1:1 entre les groupements allylamines du PAH et sulfonates du PSS quelque soit le rapport des flux.

Dans ce chapitre, la méthode de pulvérisation alternée et simultanée a été appliquée à des systèmes polysaccharidiques. Les polysaccharides, du fait de leur biocompatibilité et



leur biodégradabilité, sont intéressants et de plus en plus utilisés dans le domaine biomédical comme vecteur ou sous forme de gel. Ainsi, les films de polysaccharides sont des revêtements de choix pour la fonctionnalisation des biomatériaux.

Contrairement aux polyélectrolytes synthétiques, la pulvérisation manuelle des polysaccharides s'est révélée peu reproductible. Nous avons ainsi mis en place et utilisé un pulvérisateur automatique « fait maison ». Ce pulvérisateur a été développé par Karim Benmlih et Joseph Hemmerlé (INSERM UMR 977, Strasbourg) pour la partie technique et Mathias Lefort pour la partie informatique. Nous avons particulièrement étudié les couples chitosane/acide hyaluronique (CHI/HA), chitosane/alginate (CHI/ALG) et chitosane/chondroïtine sulfate (CHI/CS). Les films de polysaccharides obtenus par pulvérisation alternée et pulvérisation simultanée ont été caractérisés par ellipsométrie afin de suivre leur construction en fonction du temps de pulvérisation et par AFM afin de déterminer leurs topographies. Leur biocompatibilité a également été testée et comparée par suivi de l'adhésion et de la prolifération de fibroblastes gingivaux.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue Langmuir. Un résumé de cet article ainsi que l'article avec ses informations complémentaires sont données ci-dessous.

## *2. Résumé de l'article*

Le procédé de pulvérisation simultanée de CHI/HA, CHI/ALG et CHI/CS conduit à la formation de films dont l'épaisseur croît linéairement avec le temps cumulé de pulvérisation. Au contraire, dans le cas de la pulvérisation alternée, la croissance du couple CHI/HA croît super-linéairement avec le nombre d'étapes de dépôt comme cela a été décrit dans la

littérature. Dans le cas des films de CHI/ALG et CHI/CS, l'augmentation de l'épaisseur est linéaire avec le nombre de bicouches. Comme pour le système PAH/PSS étudié par Lefort *et al.* (Lefort *et al.* 2011), le paramètre essentiel influençant la construction des films par le procédé de pulvérisation simultanée est le rapport molaire des débits de pulvérisation. Ce rapport a été varié en gardant la concentration de CHI constante et en changeant la concentration des polyanions. La vitesse de croissance des films (en nm/s) dépend du rapport des débits molaires de pulvérisation polyanion/CHI, exprimé comme le rapport molaire de charges pulvérisées par seconde. Pour chaque couple, cette vitesse de croissance passe par un maximum pour un rapport de charges de 0,7 pour CHI/HA, 0,9 pour CHI/ALG et 1,2 pour CHI/CS. Dans le cas de la pulvérisation alternée, les débits de pulvérisation n'ont pas d'influence significative sur la vitesse de croissance des films. La pulvérisation simultanée apparaît être un procédé largement gouverné par la formation de complexes près ou à l'interface film/solution. La taille des complexes, formés en solution par mélange des solutions de polycations et de polyanions, a été déterminée pour différents rapport de charges. Cette taille atteint un maximum pour un rapport de charges proche de celui où la vitesse de croissance du film est maximale. Ceci renforce l'hypothèse que la croissance des films obtenus par pulvérisation simultanée est corrélée à la formation de complexes. Dans le cas du couple CHI/HA, la pulvérisation alternée permet une légère diminution du temps de construction du film par rapport à la pulvérisation simultanée. Dans le cas des couples CHI/ALG et CHI/CS, la pulvérisation simultanée permet de réduire les temps de pulvérisation de respectivement 2 et 1,5 fois pour obtenir, dans les mêmes conditions, un film de même épaisseur.

Les morphologies des films ont été étudiées par AFM à sec. Le substrat est recouvert au fur et à mesure de la construction. Deux types de morphologies ont été observés. Pour

les films construits par pulvérisation simultanée, les films CHI/HA sont constitués d'îlots tandis que les films CHI/ALG et CHI/CS ont un aspect granulaire. Les films obtenus par pulvérisation alternée ont la même morphologie que les films obtenus par pulvérisation simultanée. Cependant, la pulvérisation alternée permet d'obtenir des films trois fois plus lisses par rapport à la pulvérisation simultanée. Pour un temps de pulvérisation donné appliqué en pulvérisation simultanée, la taille des grains ou des îlots composant un film passe par un maximum qui correspond à la vitesse maximale de croissance et à la taille maximale des complexes en solution. L'influence de la force ionique et du pH a également été étudiée pour le couple CHI/CS. L'épaisseur des films augmente avec le pH de construction pour un taux de sel fixé à 150 mM NaCl. De même pour un pH fixé à 4, l'augmentation de la concentration en sel de 0 à 10 mM induit une augmentation de l'épaisseur significative du film.

Afin de tester leur biocompatibilité, des tests de viabilité et d'adhésion des fibroblastes gingivaux humains ont été menés sur les films CHI/HA, CHI/ALG et CHI/CS construits par pulvérisation alternée et simultanée. Le couple CHI/HA apparaît être le meilleur candidat en terme de viabilité et d'adhésion cellulaire que le film soit obtenu par pulvérisation alternée ou simultanée. La bonne prolifération cellulaire, le bon étalement du cytosquelette ainsi que la production de collagène de type 1 indiquent la bonne biocompatibilité d'un tel revêtement. Des tests de marquage du récepteur CD44 ont permis de mettre en évidence l'affinité spécifique des cellules avec HA.

3. *Article: Polysaccharide films built by simultaneous or alternated  
spray: a rapid way to engineer biomaterial surfaces*

Cette partie est soumise au droit d'auteur.

Les informations peuvent être trouvées sur ce lien :

Article **Polysaccharide Films Built by Simultaneous or Alternate  
Spray: A Rapid Way to Engineer Biomaterial Surfaces** publié dans Langmuir.

DOI: 10.1021/la300563s

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021%2Fla300563s>

























































4. *Informations supplémentaires de l'article*

Cette partie est soumise au droit d'auteur.

Les informations peuvent être trouvées sur ce lien :

Article **Polysaccharide Films Built by Simultaneous or Alternate Spray: A Rapid Way to Engineer Biomaterial Surfaces** publié dans Langmuir.

DOI: 10.1021/la300563s

<http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/la300563s>









## 5. Annexes : Etude préliminaire par pulvérisation manuelle

Avant les études permettant la rédaction de l'article précédent, différents tests préliminaires ont été effectués pour vérifier que la construction des films CHI/HA, CHI/ALG et CHI/CS était possible.

Ces premiers tests ont été effectués par pulvérisation manuelle avec un chitosane de masse 540 000 g/mol, HA de 420 000 g/mol, ALG et CS de 70 000 g/mol. La croissance ainsi que la morphologie des films ont été étudiées pour les trois systèmes. L'influence du rapport de charge et du séchage a été étudiée.

### 5.1. Croissance des films de polysaccharides par pulvérisation manuelle

#### 5.1.1. Solutions de polysaccharides et méthode de pulvérisation manuelle

Les solutions de polyanions, des mêmes lots que précédemment, ont été préparées dans 0,15 M NaCl à une concentration de 0,5 mg/mL. Le CHI Protasan UP B 80/500 de degré de déacétylation 83 % et de masse molaire 540 000 g.mol<sup>-1</sup> fourni par Novamatrix (CHI<sub>540</sub>) a été solubilisé dans HCl  $2 \times 10^{-3}$  M, 0,15 M NaCl à 0,3 mg/mL. Le pH des solutions a été ajusté à 4. Les solutions ont été pulvérisées avec un débit de  $15,9 \pm 4,7$  mL/min pour le chitosane et de  $20,6 \pm 0,8$  mL/min pour les polyanions. Le rapport molaire des charges respectif est de 1,1 pour CHI/HA, de 2,2 pour CHI/ALG et de 1,8 pour CHI/CS. Pour obtenir un film homogène, des mouvements haut/bas et gauche/droite ont été réalisés au cours des cycles de pulvérisation. Les cycles de pulvérisation appliqués ont été les suivants : pour un dépôt alterné, chaque solution a été pulvérisée 5 s suivi par 5 s d'attente puis 5 s de rinçage suivi de 5 s d'attente. Entre chaque pulvérisation, une étape de séchage a été effectuée. Le rinçage a été réalisé à l'eau Milli-Q® (pH 5,9), pulvérisée avec un "Air Boy" (réf.: 2430) fourni

par Roth. Pour un dépôt simultané, les deux solutions ont été pulvérisées en même temps pendant 5 s, suivi d'un temps d'attente de 10 s puis d'un rinçage de 5 s et enfin d'une étape de séchage. Dans les deux cas, les pulvérisations alternée et simultanée, le temps d'attente sert à l'élimination par drainage du surplus de solutions.

### 5.1.2. Construction et morphologie des films

La construction des films a été suivie par ellipsométrie après l'étape de séchage. La mesure de l'épaisseur du film est effectuée en fonction du nombre d'étapes de pulvérisation (Figure 41). Pour la pulvérisation alternée, une étape correspond à la pulvérisation de la solution de polyanion suivie de la solution de polycation.

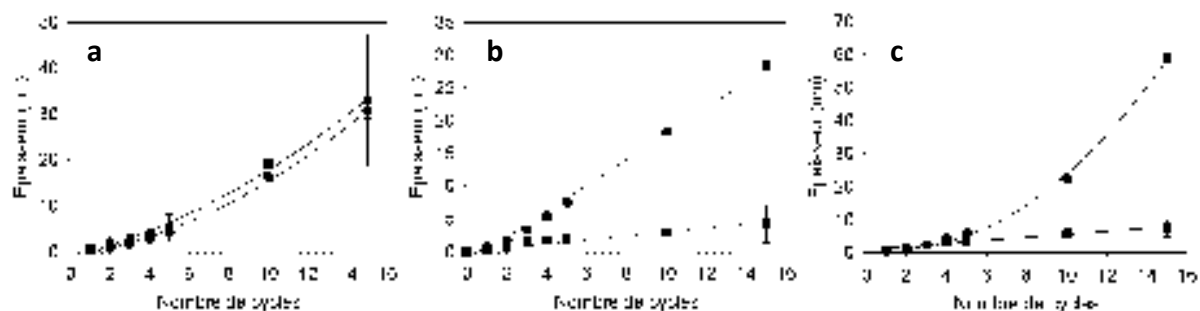


Figure 41 : Evolution de l'épaisseur mesurée par ellipsométrie des films construits par pulvérisation alternée (●) et simultanée (■) de (a) CHI<sub>540</sub>/HA, (b) CHI<sub>540</sub>/ALG et (c) CHI<sub>540</sub>/CS en fonction du nombre de cycles.

Le couple CHI/HA possède une croissance exponentielle quelque soit le type de pulvérisation employée, alternée ou simultanée contrairement à Lefort *et al.* (Lefort *et al.* 2010) pour les polyélectrolytes synthétiques et à ce que nous avons montré par pulvérisation simultanée automatisée du CHI de masse 260 000 g/mol. Une étude plus approfondie de la topographie a montré que cette exponentialité était due à une augmentation de la rugosité du film avec le nombre d'étapes de construction (Figure 42).

Tableau 4 : Evolution de l'épaisseur mesurée par ellipsométrie et de la rugosité des films CHI<sub>540</sub>/HA mesurée sur des images AFM de 10×10 μm en fonction du nombre d'étapes de pulvérisation simultanée

Nombre d'étapes pulvérisation	5	10	15	20	30
RMS (nm)	18	60	65	150	205
Epaisseur mesurée par ellipsométrie (nm)	15 ± 2	40 ± 5	54 ± 8	99 ± 20	128 ± 19

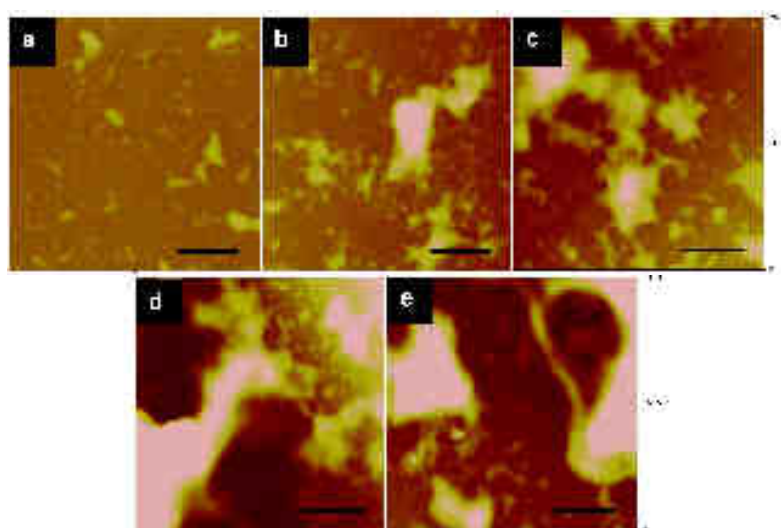


Figure 42 : Evolution de la morphologie des films CHI<sub>540</sub>/HA construits par pulvérisation simultanée manuelle en fonction du nombre d'étapes de pulvérisation (a) 5 étapes, (b) 10 étapes, (c) 15 étapes, (d) 20 étapes et (e) 30 étapes de pulvérisation. La barre d'échelle est de 5 μm et l'échelle en z est de 500 nm. Les rugosités déterminées par les images AFM sont dans le Tableau 4.

La croissance de CHI/ALG est linéaire quelque soit le type de pulvérisation. Pour le système CHI/CS, une croissance linéaire est observée pour les films obtenus par pulvérisation simultanée alors que la croissance des films est exponentielle par pulvérisation alternée. Une explication possible concernant la différence de régime de croissance pour les systèmes CHI/HA et CHI/CS étudiés ici et ceux étudiés dans l'article pourrait être liée à la différence de type de chitosane (le premier est une base du chitosane et deuxième est un sel de chlorure de chitosane), à la différence de masse molaire, 540 000 g/mol ici contre 260 000 g/mol dans l'article ou encore au type de pulvérisation (manuelle ou automatique).

La topographie des films a également été étudiée par AFM à sec, en mode contact (Figure 43). Quatre types de morphologies ont été observés. Le couple CHI/HA construit par pulvérisation alternée et simultanée est plutôt de type gel, très hydraté. Le film construit par pulvérisation alternée recouvre totalement la surface après 15 étapes alors que celui construit par pulvérisation simultanée ne recouvre pas la surface après 15 étapes. Les films CHI/CS obtenus par pulvérisation alternée sont granulaires alors que ceux obtenus par pulvérisation simultanée possède une structure fibreuse, comme les films CHI/ALG obtenus par pulvérisation simultanée. Ces deux films ne recouvrent pas le substrat après 15 étapes de pulvérisation. Les films CHI/ALG construits par pulvérisation alternée sont très lisses et recouvrent totalement la surface après 15 bicouches. De manière générale les films construits par pulvérisation simultanée sont plus rugueux que ceux obtenus par pulvérisation alternée, ce qui est en accord avec l'article précédent.

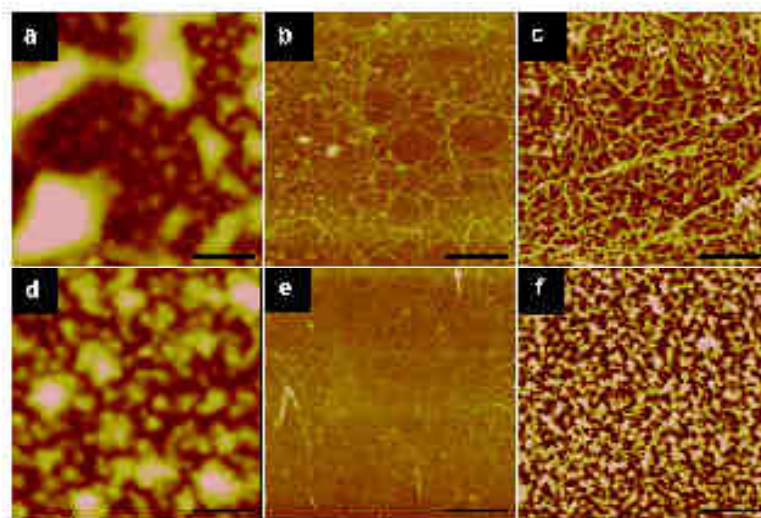


Figure 43 : Morphologies observées par microscopie à force atomique des films construits par pulvérisation simultanée de (a) CHI<sub>540</sub>/HA, (b) CHI<sub>540</sub>/ALG, (c) CHI<sub>540</sub>/CS et par pulvérisation alternée de (d) CHI<sub>540</sub>/HA, (e) CHI<sub>540</sub>/ALG, (f) CHI<sub>540</sub>/CS. La barre d'échelle est de 1  $\mu$ m et l'échelle en z est de 100 nm pour (a) et de 40 nm pour (b-f).

5.2. Influence du rapport de charges sur la construction des films de polysaccharides par pulvérisation manuelle

Nous avons étudié l'influence du rapport molaire de charge polyanion/CHI sur la vitesse de construction des films CHI/HA et CHI/CS obtenus par pulvérisation simultanée. Ce rapport n'a que peu d'influence sur la construction des films obtenus par pulvérisation alternée (Figure 44). Les flux des polyanions (HA et CS) ont été variés en modifiant la concentration des solutions pulvérisées tandis que le flux de chitosane a été maintenu constant à  $14,5 \pm 0,75$  mL/min. Comme le montre la Figure 45, quelque soit le système, la vitesse de croissance augmente rapidement jusqu'à atteindre un maximum puis diminue lorsque le rapport de charge augmente. Le maximum de vitesse de croissance est obtenu pour un rapport de charge de 1,19 pour CHI/HA et de 1,38 pour CHI/CS.

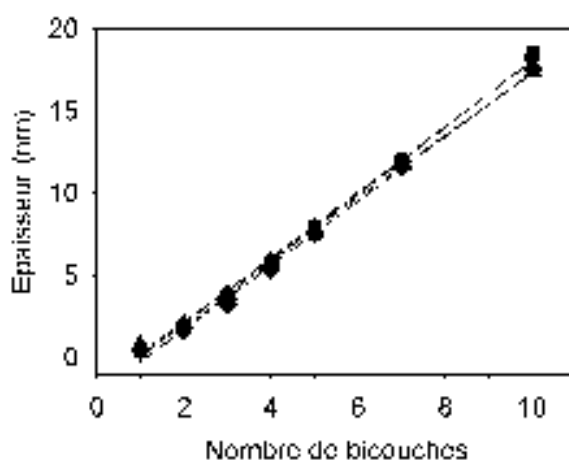


Figure 44 : Evolution de l'épaisseur mesurée par ellipsométrie des films CHI<sub>540</sub>/ALG construits par pulvérisation alternée manuelle en fonction du nombre de bicouches pour différentes concentrations en ALG de rapport molaire de charge 1,51 (▲), 3,01 (■), 4,52 (◆) et 6,02 (●).

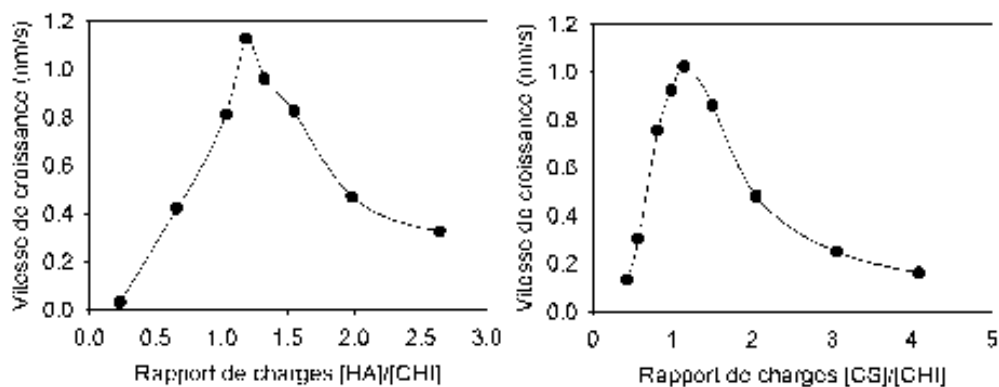


Figure 45 : Influence du rapport de charge polyanion/CHI sur la vitesse de croissance des films construits par pulvérisation simultanée manuelle de (a) CHI/HA et (b) CHI/CS.

Malgré de légères différences sur la valeur de l'optimum du rapport de charge, le procédé de pulvérisation simultanée semble assez robuste.

### 5.3. Influence du séchage sur la construction des films de polysaccharides par pulvérisation manuelle alternée

Des tests ont été effectués afin d'étudier l'influence du séchage sur la construction des films. Pour cela deux séries de films ont été réalisés par pulvérisation alternée : une avec une étape de séchage entre chaque cycle de construction appelée « films avec séchage », une autre avec une seule étape de séchage réalisé avant la mesure de l'épaisseur par ellipsométrie, appelée « films sans séchage ». Les solutions ont été préparées dans 150 mM NaCl et ajustées à pH4. Le chitosane utilisé est le sel de chlorure de masse 260 000 g/mol à une concentration de 0,3 mg/mL, HA à 0,6 mg/mL, ALG à 0,23 mg/mL et CS et l'héparine (HEP) à 0,5 mg/mL. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 5 ci-dessous :

Tableau 5 : Influence de l'étape de séchage après 10 cycles de pulvérisation sur l'épaisseur et la rugosité des films construits par pulvérisation alternée. Les épaisseurs ont été mesurées par ellipsométrie et les rugosités par AFM sur des images de  $10 \times 10 \mu\text{m}$ .

Couples étudiés	Epaisseur sans séchage (nm)	Epaisseur avec séchage (nm)	RMS sans séchage (nm)	RMS avec séchage (nm)
CHI/HA	$24,7 \pm 0,9$	$22,6 \pm 0,4$	24	20
CHI/ALG	$20,2 \pm 0,2$	$19,7 \pm 0,2$	3	2
CHI/CS	$44,3 \pm 1,6$	$44,9 \pm 0,9$	21	23
CHI/HEP	$20,9 \pm 0,4$	$22,1 \pm 0,2$	5	2

Aucune influence de l'étape de séchage n'est observée sur l'épaisseur des films. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Izquierdo *et al.* (Izquierdo *et al.* 2005). Par contre, sauf dans le cas du couple CHI/CS, une faible augmentation de la rugosité est constatée lorsque les films ne sont pas séchés entre chaque cycle.

Au vu des courbes de construction des films obtenus par pulvérisation simultanée (Figure 41 b-c) et des images d'AFM (Figure 43 a-c), les films CHI/ALG et CHI/CS construit par pulvérisation simultanée ont une croissance relativement faible et ne recouvrent pas le substrat après 15 étapes de pulvérisation. Nous avons donc par la suite déposé une sous-couche de poly(éthylène imine) (PEI), polycation ramifié, pour permettre une meilleure accroche des films. La Figure 46 représente l'évolution de l'épaisseur des films CHI/ALG et CHI/CS en fonction du nombre de cycles lorsque la construction est réalisée avec ou sans couche d'accroche. La couche d'accroche permet d'obtenir des épaisseurs plus élevées. La pulvérisation de cette sous-couche de PEI a donc été conservée pour la suite des expériences.



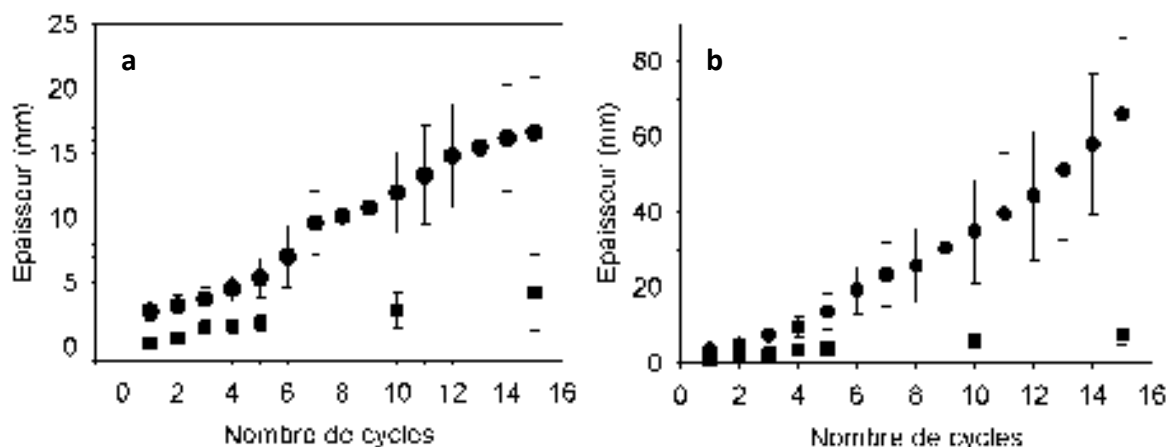


Figure 46 : Evolution de l'épaisseur mesurée par ellipsométrie en fonction du nombre de cycles, des films de (a) CHI<sub>540</sub>/ALG et (b) CHI<sub>540</sub>/CS construits par pulvérisation simultanée (●) avec sous couche d'accroche de PEI et (■) sans sous-couche d'accroche de PEI

Au vu des barres d'erreur sur l'épaisseur des films, la pulvérisation simultanée manuelle apparaît être beaucoup moins reproductible que la pulvérisation alternée manuelle (Figure 41(a) et Figure 46). Nous nous sommes donc tournés vers la pulvérisation automatisée pour minimiser l'influence de l'opérateur et améliorer la reproductibilité.

## 6. Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre qu'il était possible de construire des films de polysaccharides par pulvérisation automatique alternée et simultanée.

La pulvérisation simultanée des solutions de polysaccharides aboutit à la construction de films par accumulation de complexes. L'épaisseur des films croît linéairement avec le temps cumulé de pulvérisation. La vitesse de croissance dépend du rapport molaire de charge polyanion/CHI et atteint un maximum pour un rapport de charge proche de 1. Pour chaque système étudié, ce rapport de charge optimal est proche de celui où la taille des complexes est maximale. Ceci renforce l'hypothèse que les films obtenus par pulvérisation simultanée sont construits par accumulation de complexes à la surface du substrat. Les morphologies des films sont différentes selon le couple de polysaccharides : granulaire pour

CHI/ALG et CHI/CS, sous forme d'îlots pour CHI/HA. Les films obtenus par pulvérisation simultanée ont une rugosité supérieure à celle des films construits par pulvérisation alternée. Les films composés de CHI/HA présentent une meilleure biocompatibilité envers les fibroblastes gingivaux humains et ce, quelque soit le procédé de pulvérisation. De plus, la pulvérisation simultanée s'avère être une méthode assez robuste. En effet, malgré des changements du type de chitosane utilisé ou de la méthode de pulvérisation (manuelle ou automatisée), les tendances observées sont les mêmes. La pulvérisation du couple de polysaccharides CHI/HA s'avère être un procédé prometteur afin de préparer des films nanométriques appliqués à la fonctionnalisation des biomatériaux.

Le chapitre suivant traite de la fonctionnalisation des films de polysaccharides par un peptide antibactérien et antifongique.

## Chapitre V Fonctionnalisation de films en vue d'applications biomédicales

### 1. Introduction

N.B : Les numéros de figures ainsi que les numéros de références renvoient à une numérotation indépendante du reste du manuscrit. Ils correspondent à ceux de l'article qui sera soumis à un journal scientifique.

Les implants médicaux sont très largement utilisés : depuis le domaine de la chirurgie pour le remplacement de tissus défectueux ou manquants à l'administration de liquide ou gaz par l'intermédiaire de cathéters. La prévention contre la colonisation de ces implants par des pathogènes est un des principaux problèmes médicaux et sociaux. En effet l'infection par des micro-organismes reste une des complications les plus sérieuses après un acte chirurgical. Chaque année en Europe, 5% des patients admis dans les hôpitaux contractent une maladie nosocomiale et 10% d'entre eux en meurent (Guggenbichler *et al.* 2011). La bactérie *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) est responsable d'une grande partie des infections nosocomiales particulièrement chez les patients immunodéprimés. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est également souvent impliqué dans les infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus virulentes qui contribue à un fort taux d'infections systémiques et de mortalité liées aux implants (Katneni and Hedayati 2007). *Candida albicans* (*C. albicans*) est le plus courant des pathogènes fongiques chez l'être humain. Ce champignon se développe sous forme de bio-films qui sont source d'infections locales et systémiques. Les biofilms de *C. albicans* permettent également le développement de microcolonies de *S. aureus* et augmentent leur résistance face aux antibiotiques (Harriott and Noverr 2009). Lorsqu'elles sont accompagnées d'infections bactériennes, les infections fongiques augmentent la

fréquence ou la sévérité de la maladie (Carlson 1983; Klotz *et al.* 2007; Shirtliff *et al.* 2009). La grande résistance de *C. albicans* face aux thérapies antifongiques (Lupetti *et al.* 2002; Ramage *et al.* 2006) et de *S. aureus* face aux antibiotiques montre bien la nécessité de revêtements multifonctionnels, à la fois antifongiques et antibactériens.

Différentes approches ont été étudiées : l'immobilisation ou la libération de substances antibactériennes impliquant l'auto-assemblage de monocouches, le greffage de polymères ou les multicouches de polyélectrolytes (Banerjee *et al.* 2011; Glinel *et al.* 2012). Les multicouches de polyélectrolytes sont une méthode simple pour fonctionnaliser les surfaces de manière contrôlée (Decher 1997; Gribova *et al.* 2012). Les premières multicouches antibactériennes ont été développées par insertion de nanoparticules d'argent (Dai and Bruening 2002; Lee *et al.* 2005; Lee *et al.* 2005b; Fu *et al.* 2006; Li *et al.* 2006; Shi *et al.* 2006). Puis, d'autres molécules ont été insérées dans les films multicouches pour obtenir un effet antibactérien : l'utilisation d'un bactéricide hydrophobe et de copolymères bloc dendritiques (Nguyen *et al.* 2007) ou le remplissage de liposomes contenant des ions argent (Malcher *et al.* 2008). Les multicouches à base de chitosane possèdent également des propriétés antibactériennes contre *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* (Fu *et al.* 2005; Bratskaya *et al.* 2007). Par la suite, des antibiotiques, tel que la gentamicine, ont été intégrés dans des multicouches hydrolisables (Chuang *et al.* 2008) ou réticulées (Pavlukhina *et al.* 2010) pour être libérés par la suite. Cependant, ces techniques ne donnent pas entière satisfaction du fait de leur efficacité limitée, de leur toxicité ou de l'apparition de résistance des pathogènes (Verran and Whitehead 2005; Bruellhoff *et al.* 2010).

Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont sécrétés par de nombreux organismes vivants pour lutter contre les pathogènes. Ils possèdent un large spectre d'activité

antimicrobienne et une faible cytotoxicité. Ces critères ont permis le développement de l'intérêt qui leur est porté. Les PAMs provoquent la rupture de l'intégrité de la membrane des pathogènes, ce qui évite le phénomène de résistance. Ces PAMs, chargés positivement, ont été intégrés dans l'architecture des multicouches de polyélectrolytes pour obtenir un effet antibactérien par contact (Etienne *et al.* 2004) ou par libération (Pavlukhina *et al.* 2010; Shukla *et al.* 2010). Guyomard *et al.* ont réussi à insérer des complexes de PAMs hydrophobes et de polyélectrolytes amphiphiles dans des multicouches de polyélectrolytes pour obtenir une activité antibactérienne contre des bactéries à gram positif (Guyomard *et al.* 2008). La chromogranine A, sécrétée par l'organisme soumis à un stress, est une protéine endogène participant à l'immunité innée. Un peptide dérivé de la chromogranine A a été intégré dans des films multicouches (Etienne *et al.* 2005) pour leur conférer des propriétés antifongiques. La Cateslytine bovine (CTL) est un peptide antimicrobien dérivé de la chromogranine A (344-358). Il possède un large spectre d'activité, spécialement contre *S. Aureus*, *M. Luteus* et *C. albicans*. CTL est active à des concentrations micromolaires et est non toxique vis-à-vis des cellules (Briolat *et al.* 2005; Shooshtarizadeh *et al.* 2010). De plus, elle est stable vis-à-vis des protéases sécrétées par les bactéries (Aslam *et al.* 2012). Seuls quelques systèmes, principalement basés sur des revêtements à base d'ions argent (Prucek *et al.* 2011), de tensio-actifs cationiques à ammonium quaternaire (Botequim *et al.* 2012), de polymères synthétiques (Hu *et al.* 2005) ou des silanes (Oosterhof *et al.* 2006) sont à la fois antibactériens et antifongiques.

A notre connaissance, nous présentons dans ce chapitre, le premier revêtement biocompatible et biodégradable composé de polysaccharides et d'un peptide antimicrobien à la fois antibactérien et antifongique. La CTL a été immobilisée sur la surface par enfouissement au sein d'un film de polyélectrolyte chitosane/acide hyaluronique (CHI/HA)

lors de sa construction par greffage de la CTL sur l'acide hyaluronique (HA). La construction et la topographie des films HA-CTL/CHI ont été étudiées par Microbalance à Cristal de Quartz à Dissipation (QCM-D) et par Microscopie à Force Atomique (AFM). Leur biocompatibilité a également été testée par suivi de l'adhésion et de la prolifération de fibroblastes gingivaux.

Les résultats de cette étude seront soumis à un journal scientifique. Un résumé ainsi que le projet d'article avec ses informations complémentaires sont données ci-dessous.

## 2. Résumé du projet d'article

La cateslytine a été couplée covalamment à 5% à l'acide hyaluronique en deux étapes : une étape de greffage du groupe maléimide sur HA puis une étape de couplage thiol/maléimide. Pour permettre ce greffage, une cystéine a été greffée en C-terminal du peptide. Les activités antibactérienne et antifongique de la cateslytine modifiée par la cystéine et celle de la CTL greffée au HA ont été testées en solution vis-à-vis de deux souches bactériennes, *M. luteus* et *S. aureus* et d'une levure, *C. albicans*. Malgré une augmentation de la concentration minimale inhibitrice, le peptide modifié ou greffé reste actif.

L'activité de la CTL a ensuite été étudiée lorsqu'elle était incorporée dans un film multicouche de HA-CTL/CHI. Pour cela, la construction de tels films a tout d'abord été analysée par QCM-D. Une diminution de fréquence ainsi qu'une forte augmentation de la dissipation sont observées à chaque dépôt de polysaccharides, preuve que le film HA-CTL/CHI se construit. Des images de microscopie à force atomique en liquide en mode PeakForce® ont été réalisées pour étudier la topographie de ces films. Ceux-ci présentent une topographie très hétérogène et une forte rugosité ce qui peut expliquer les grandes valeurs de dissipation obtenues par QCM-D. HA-CTL/CHI a été comparé au film HA/CHI

construit de la même manière : ces derniers sont beaucoup moins rugueux et plus homogènes. Le greffage de CTL sur HA modifie la topographie des films obtenus. L'activité des films a été étudiée pendant 24h, en fonction de la quantité de CTL introduit en modulant le nombre de bicouches HA-CTL/CHI dans les films PEI-(HA/CHI)<sub>15-n</sub>-(HA-CTL/CHI)<sub>n</sub> avec n = 0, 1, 5, 10, 15 et PEI-(HA-CTL/CHI)<sub>30</sub>. L'augmentation du nombre de bicouches HA-CTL/CHI diminue la prolifération des pathogènes. La prolifération de *M. luteus*, *C. albicans* et *S. aureus* est totalement inhibée après 24h pour respectivement 5, 15 et 30 bicouches. La réutilisation des films HA-CTL/CHI a également été évaluée. Dans le cas de *C. albicans*, les films sont réutilisables avec une suspension fraîche de pathogène avec une activité de 100% d'inhibition pendant 3 jours. Pour *S. aureus*, après deux jours, l'inhibition n'est que de 40%. Le surnageant ne contient pas ou trop peu de peptide libéré et ne permet plus d'inhiber la croissance des pathogènes.

Pour étudier le mécanisme d'action de la CTL, les polymères marqués à la fluorescéine HA<sup>FITC</sup>-CTL et HA<sup>FITC</sup> ont été synthétisés pour observer *C. albicans* par microscopie confocale, après 45 min de contact avec HA<sup>FITC</sup>-CTL et HA<sup>FITC</sup> en solution ou avec les films CHI/HA<sup>FITC</sup>-CTL et CHI/HA<sup>FITC</sup>. Le peptide avec le polymère pénètre la membrane de *C. albicans*, ce qui engendre une accumulation de HA dans le cytoplasme et explique l'activité du peptide. Les pathogènes utilisés ici sont connus pour sécréter de la hyaluronidase, une enzyme qui dégrade HA. Par contact avec les bactéries, les films sont donc dégradés et libèrent CTL qui provoque l'éradication des pathogènes.

Enfin, la non-cytotoxicité de ces films a été vérifiée par des tests de viabilité sur des fibroblastes gingivaux humains cultivés sur les films (HA-CTL/CHI)<sub>15</sub>. L'activité métabolique des cellules diminue et le nombre de cellules vivantes n'est que de 25% par rapport à celui

sur les films HA/CHI après 7 jours de culture. Pour différencier la cytotoxicité et la non adhésion des cellules, les cellules du surnageant des films HA-CTL/CHI ont été prélevées puis remises en culture sur un substrat de verre nu. Après une 24 heures en suspension au contact de CHI/HA-CTL, les cellules déposées ont proliféré. Ceci prouve la non-cytotoxicité de ces revêtements et leur caractère anti-adhésif.



*3. Projet d'article : Multi-targeted pathogens by biodegradable polyelectrolyte multilayer coatings based on embedded antibacterial and antifungal peptide*

G. Cado<sup>1,+</sup>, R. Aslam<sup>2,3,+</sup>, A. Parat<sup>1</sup>, R. Fabre<sup>2,3</sup>, J.-C. Voegel<sup>2,3</sup>, Y. Frère<sup>1</sup>, P. Schaaf<sup>1,4,5</sup>, L. Jierry<sup>1,4,5</sup>, F. Schneider<sup>6</sup>, M.-H. Metz-Boutigue<sup>2,3</sup> and F. Boulmedais<sup>1,5,\*</sup>

1 Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Charles Sadron, UPR 22, 23 rue du Loess, 67034 Strasbourg, France.

2 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, UMR 977), 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France.

3 Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France.

4 Université de Strasbourg, Ecole Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg, France.

5 International Center for Frontier Research in Chemistry, 8 allée Gaspard Monge, 67083 Strasbourg, France.

6 Service de Réanimation Médicale, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France.

RECEIVED DATE (to be automatically inserted after your manuscript is accepted if required according to the journal that you are submitting your paper to)

CORRESPONDING AUTHOR FOOTNOTE: fouzia.boulmedais@ics-cnrs.unistra.fr, tel: +33 (0) 3 88 41 41 60, fax: +33 (0) 3 88 41 40 00 + These authors contributed equally

## Abstract

Prevention of pathogen colonization of medical implants is a major medical and social issue since infection by microorganisms is one of the most serious complication after surgery. Immobilization of antimicrobial molecules on biomaterials is an efficient approach to prevent biofilm formation. We report here the first biocompatible and biodegradable coating that is both antibacterial and antifungal. The properties of these polysaccharide multilayer films are based on the immobilization of cateslytin (CTL), an endogenous antimicrobial peptide that is both antibacterial and antifungal. CTL-functionalized hyaluronic acid and chitosan (HA-CTL-C/CHI) were deposited on a planar surface with the aim of designing a bioinspired self-defensive coating. Functionalized polysaccharide films reveal to be highly efficient against two bacteria strains (*Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*) and against a yeast *Candida albicans*. Moreover, HA-CTL-C/CHI films prevent the adhesion of human gingival fibroblasts without being cytotoxic. These properties open the route for the design of efficient coatings for preventing catheter-related infections.

## Keywords

Layer-by-layer, chitosan, hyaluronic acid/hyaluronan, fibroblasts, antimicrobial peptide

## Introduction

Implantable medical devices are widely used in surgery to replace altered or lost tissues but also for fluid or gas administration using catheters. These constitute an open gate for invasion of pathogens. Prevention of pathogen colonization of medical implants constitutes a major medical and social issue since infection by microorganisms represents one of the most serious complications after surgery. Each year in Europe, 5% of patients

admitted to hospitals suffer from hospital-acquired infections leading to a mortality of 10%<sup>[1]</sup>. *Micrococcus luteus* (*M. luteus*), Gram-positive bacteria, is responsible for hospital-acquired infections especially in immunocompromized patients. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), also often implicated in hospital-acquired diseases, is one of the most virulent bacteria leading to high rates of device-related systemic infection and mortality<sup>[2]</sup>. *Candida albicans* (*C. albicans*), the most common human fungal pathogen, has the ability to form biofilms that are sources of local and systemic infection. Moreover *C. albicans* biofilms allow the formation of *S. aureus* microcolonies on their surface and even enhanced *S. aureus* resistance to antibiotics<sup>[3]</sup>. When associated with bacterial infections, fungal proliferation induces an increased frequency or severity of diseases<sup>[4-6]</sup>. The high resistance of *C. albicans* to antifungal therapies<sup>[7, 8]</sup> and of *S. aureus* to antibiotics points out the need of multifunctional coatings that are both antifungal and antibacterial.

Various synthetic approaches based on immobilization or release of bactericidal substances, using self-assembled monolayers or grafting of polymers have been explored and extensively reviewed<sup>[9, 10]</sup>. Polyelectrolyte multilayer (PEM) films, based on alternated deposition of polycations and polyanions onto a solid surface, emerged as a simple and efficient approach to functionalize surfaces in a controlled way<sup>[11, 12]</sup>. The first antibacterial PEM films were designed by insertion of silver nanoparticles<sup>[13-18]</sup>. Later on, hydrophobic bactericide using dendritic block copolymer<sup>[19]</sup> and silver ion containing liposomes<sup>[20]</sup> were inserted in PEM films to obtain bactericidal coatings. Chitosan based PEM films were demonstrated to be antibacterial against *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*<sup>[14, 21, 22]</sup>. Antibiotics, like gentamicin, have been inserted in hydrolysable<sup>[23]</sup> or crosslinked PEM films<sup>[24]</sup> to be released later on. The use of antibiotics or silver particles have serious

drawbacks because of their limited efficiency, their toxicity or their role in the emergence of multi-resisting pathogens<sup>[25, 26]</sup>.

Antimicrobial Peptides (AMPs), secreted by numerous living organisms against pathogens, have gained continuously more attention due to their broad spectrum of antimicrobial activity and their low cytotoxicity. They predominantly cause the disruption of the membrane integrity of pathogen agents and are thus unlikely to initiate development of resistance<sup>[10]</sup>. Positively charged AMPs were already used as a part of the PEM architecture to obtain antibacterial effect by contact<sup>[27]</sup> or by release<sup>[24, 28]</sup>. Guyomard et al. have succeeded in embedding in PEM films a complex of poorly water soluble AMPs and amphiphilic polyelectrolytes. They observed antibacterial activity against gram positive bacteria<sup>[29]</sup>. Antifungal PEM films with embedded antifungal peptides were also reported<sup>[30, 31]</sup>. Yet it would be highly desirable to design coatings possessing both antibacterial and antifungal properties. Up to now only few systems that share both properties, mainly based on silver coating<sup>[32]</sup> or quaternary ammonium cationic molecules as surfactant<sup>[33]</sup>, synthetic polymer<sup>[34]</sup> or silane<sup>[35]</sup>, were studied. To our knowledge, no coating based on AMP peptides possessing both properties has been reported so far.

To achieve this goal, we make use a derived peptide of Chromogranin A (CGA), an endogenous protein, which is secreted with its numerous natural derived peptides by the organism under stress as actor of innate immunity. It is secreted by exocytosis from nervous, endocrine and immune cells. Bovine Cateslytin peptide (CTL), is an AMPs corresponding to CGA344-358, with a wide spectrum of antimicrobial activities, especially against *S. aureus*, *M. luteus* and *C. albicans*. CTL acts in the micromolar range and is non-toxic for mammalian cells<sup>[36, 37]</sup>. Moreover, it is very stable against the bacterial proteases<sup>[38]</sup>. We used

polysaccharide multilayer films based on CTL-C-functionalized hyaluronic acid and chitosan (HA-CTL-C/CHI) that were deposited on a planar surface with the aim to design a self-defensive coating. HA and CHI are biodegradable by enzymatic hydrolysis with chitosanase<sup>[39]</sup> and hyaluronidase<sup>[40]</sup>, respectively. Both polysaccharides are already widely used in biomedical applications due to their interesting intrinsic properties<sup>[41, 42]</sup>. The ability of *Staphylococcus*<sup>[43]</sup> and *Candida* species<sup>[44]</sup> to degrade HA, by producing hyaluronidase, allows the CTL to be released from PEM films only in the presence of the pathogens. PEM films that release antibacterial compounds (AMPs or classical antibiotics) without the need of stimulus<sup>[29, 30]</sup> or in response to pH<sup>[23, 28]</sup> were previously reported but never in response to the proteolytic environment due to the pathogens itself. The buildup and the topography of the films were characterized by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (QCM-D) and by Atomic Force Microscopy (AFM), respectively. Antibacterial and antifungal activities of HA-CTL-C in solution and HA-CTL-C/CHI films were tested against two Gram-positive bacteria, i.e. *S. aureus* and *M. luteus* and a yeast *C. albicans*, respectively by using microdilution assays<sup>[45]</sup>. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) allows demonstrating the penetration of the fluorescently labeled HA<sup>FITC</sup>-CTL-C, diluted in solution or embedded in a PEM film, into the cell membrane of *C. albicans*. Viability tests of Human gingival fibroblasts (HGFs) were also performed.

### Results and discussion

In order to be grafted to HA, CTL-C was synthesized with a cystein residue at the C-terminal end of CTL. CTL-C peptides were covalently coupled to HA in two steps using successively the carbodiimide chemistry to graft maleimide functions and the thiol-maleimide coupling reaction to graft CTL-C. Synthetic procedures of CTL-C peptide and its

conjugation to HA are described in Supporting Information (SI). After dialysis and freeze-drying, a coupling rate of 5% was determined by  $^1\text{H-NMR}$ , corresponding to the grafting of approximately 5 CTL-C peptides for 100 HA monomer units (Figure 1a).

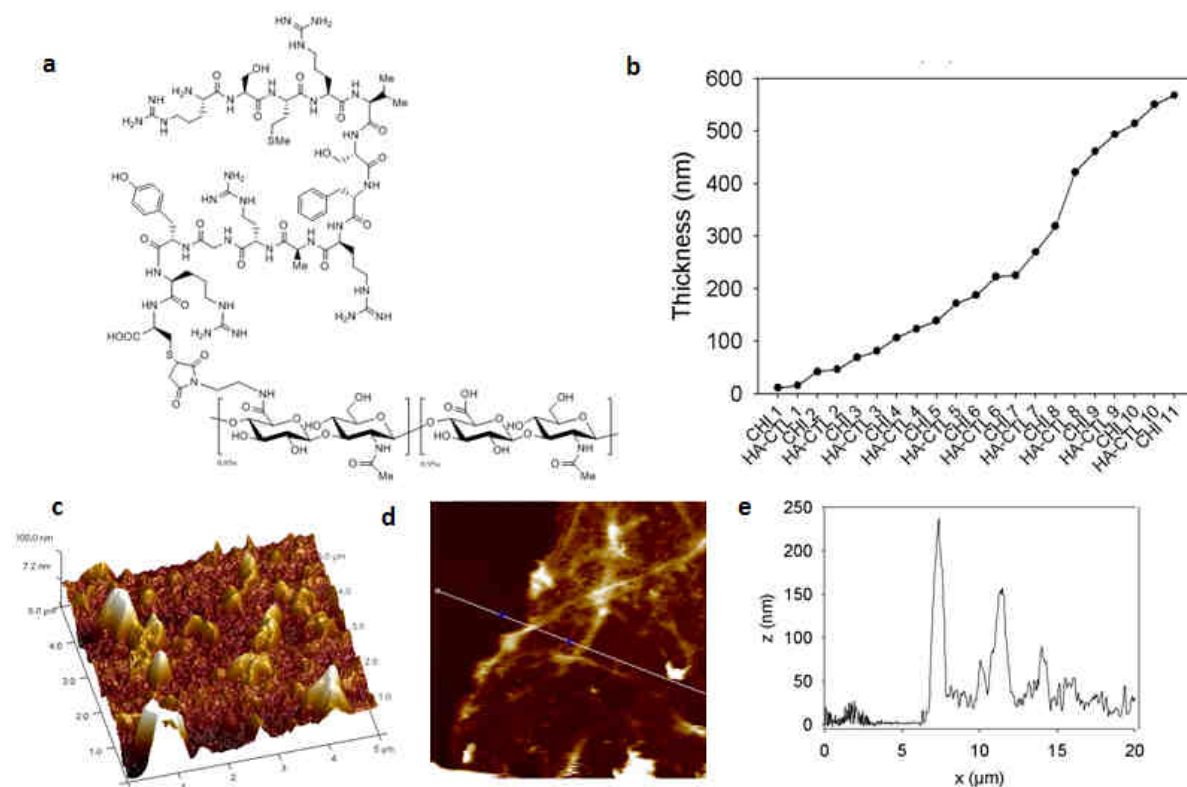


Figure 1: (a) Formulae of CTL-C functionalized hyaluronic acid, HA-CTL-C (b) Evolution of CHI/HA-CTL-C film thickness, measured by QCM-D and calculated from the Voigt-Voinova model (Voinova et al. 1999), as a function of the deposited layer. AFM images, obtained in PeakForce Tapping® mode in liquid, of [CHI/HA-CTL-C]<sub>10</sub>-CHI multilayer film: (c) non-scratched ( $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , z scale of 200 nm), (d) scratched film ( $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ , z scale of 400 nm) and (e) its profile section. (d) The films were built in 150 mM NaCl at pH 4.

The antimicrobial and antifungal activities of CTL-C and HA-CTL-C were then tested in solution against two bacterial strains *M. luteus* and *S. aureus* and a yeast *C. albicans*. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) in peptide of HA-CTL-C and CTL-C were determined using bacterial and fungal assays described in SI. Compared to the free peptide, MIC values of HA-CTL-C increases from 80 to 100  $\mu\text{M}$  for *S. aureus* and from 40 to 50  $\mu\text{M}$  for *C. albicans* (Table 1). In the case of *M. luteus*, the MIC of HA-CTL-C (10  $\mu\text{M}$ ) is five times higher than free CTL-C (2  $\mu\text{M}$ ). In spite of this decrease in efficiency, the CTL-C peptide covalently linked to HA polymer can still be considered as antimicrobial, acting at a micromolar range.

Table 1: Minimal inhibitory concentration (MIC in  $\mu\text{M}$ ) of CTL-C and HA-CTL-C measured in solution against different pathogens. In the case of HA-CTL-C, the MIC values given correspond to the concentration in CTL-C.

	MIC ( $\mu\text{M}$ in peptide)	
	CTL-C	HA-CTL-C
<i>M. luteus</i>	2	10
<i>S. aureus</i>	80	100
<i>C. albicans</i>	40	50

The buildup of HA-CTL-C/CHI film was monitored by QCM-D. A linear decrease of the normalized frequency shift is observed at each deposited layer of polysaccharide indicating the buildup of the film up to 10 bilayers (Figure S1a in SI). High dissipation values were recorded and are of the order of  $425 \times 10^{-6}$  for 10 deposited layers (Figure S-1b in SI). The film thickness, determined from QCM-D data using the Voigt-Voinova model<sup>[46]</sup>, increases super-linearly with the number of layers. This super-linear growth has been previously noted for PEM films, especially ones based on polysaccharides<sup>[47]</sup> or polypeptides<sup>[48]</sup>. AFM allows imaging the film topography and determining its roughness (RMS) which is about 25 nm (Figure 1c). HA-CTL-C/CHI films are composed of large hills having a height around 250 nm distributed throughout the film. The film thickness can also be determined by AFM after scratching. The whole surface of the substrate is covered by a film of 35 nm in thickness (Figure 1c). The film exhibits a significant roughness that overestimates its hydrodynamic thickness measured by QCM-D and explains the high dissipation values. Indeed, one must keep in mind that QCM-D is sensitive to mass including the bound water. In other terms, this technique measures the hydrodynamic film thickness which roughly corresponds to the largest extension of the film. The functionalization of HA by CTL-C peptides thus changes the topography of PEM films. In comparison, HA/CHI films have a roughness of 3 nm for a film thickness of about 14 nm (Figure S-2 in SI).

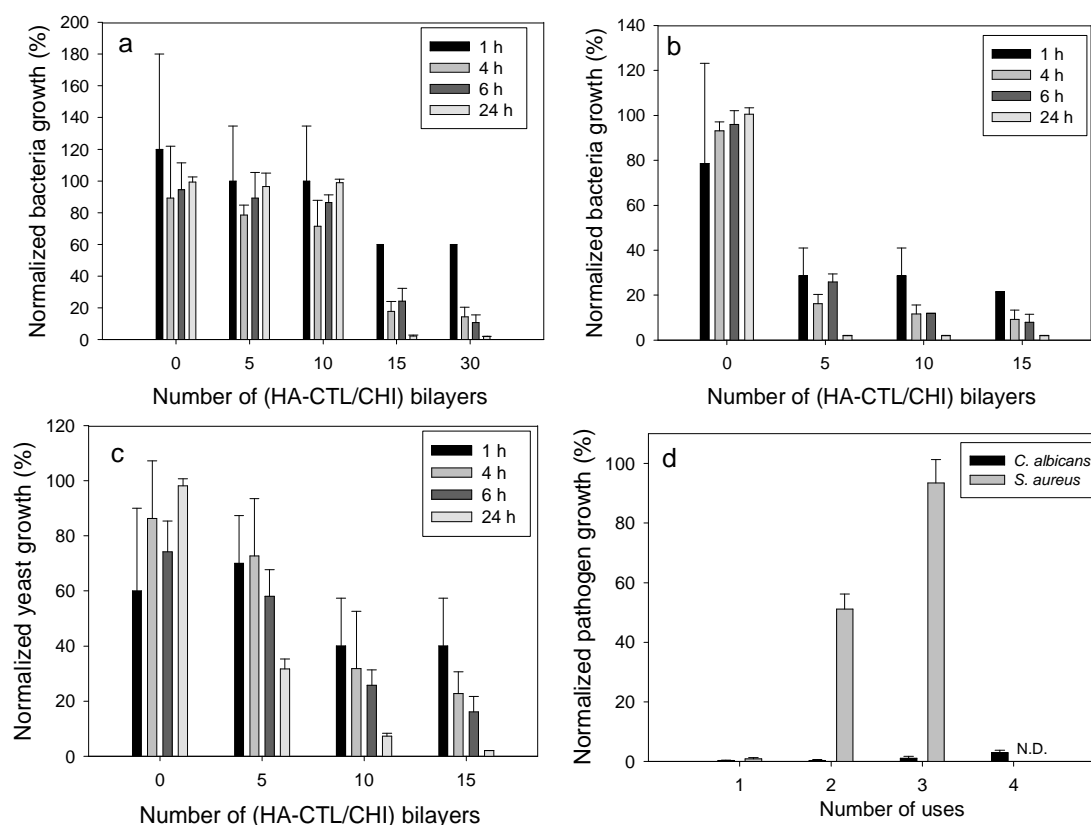


Figure 2: Normalized growth of (a) *S. aureus*, (b) *M. luteus* and (c) *C. albicans* incubated for 1 to 24 h in contact with PEI-(HA/CHI)<sub>15-n</sub>-(HA-CTL-C/CHI)<sub>n</sub> with  $n = 0$  to 15 and (HA-CTL-C/CHI)<sub>30</sub> multilayer films. (d) Normalized growth of *C. albicans* and *S. aureus* incubated during 24h on respectively PEI-(HA-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> and PEI-(HA-CTL-C/CHI)<sub>30</sub> films as a function of the number of uses. Every 24h after the withdrawn of the supernatant, the film was put in contact with a fresh pathogen suspension. The films were built in 150 mM NaCl at pH 4. The normalization was performed with respect to OD<sub>620</sub> measured in the absence of film and antibiotics taken as 100% growth and in the presence of antibiotic taken as 0% growth. ND means not determined.

After characterization of the buildup of CHI/HA-CTL-C multilayer films, the antibacterial and antifungal activities of the functionalized films were evaluated against two bacteria strains *M. luteus* and *S. aureus* and one yeast strain *C. albicans*, respectively. To study the influence of the number of embedded functionalized layers, the growth of pathogens was monitored in presence of different films with the increase of the number of HA-CTL-C/CHI bilayers. To this aim, PEI-(HA/CHI)<sub>15-n</sub>-(HA-CTL-C/CHI)<sub>n</sub> films, with  $n = 0, 5, 10$  and 15, and PEI-(HA-CTL-C/CHI)<sub>30</sub> were built. Pathogens were incubated during 24 h in contact with CHI/HA-CTL-C films at 37°C for bacteria strains and at 30°C for *C. albicans*. For each pathogen, the microbial growth was measured at different times (1 h, 4 h, 6 h and 24 h) by determining the optical density at 620 nm (OD<sub>620</sub>) of the bacterial suspension in contact



---

with the film. The data were normalized to the  $OD_{620}$  value obtained in similar conditions in the absence of films and are expressed as a percentage of growth (Figure 2a-c). For each tested pathogen, we observed that increasing the number of HA-CTL-C/CHI bilayers decreases the normalized microbial growth. A very significant decrease of microbial growth is obtained for a minimum of 5 bilayers against *M. luteus* and *C. albicans* and of 15 bilayers for *S. aureus*. After 6h of incubation, at least 70% of inhibition is obtained with 15 bilayers for all the tested pathogens. After 24h of incubation, the growth of *M. luteus*, *C. albicans* and *S. aureus* are fully inhibited with 5, 15 and 30 HA-CTL-C/CHI bilayers, respectively. These results are in accordance with the MIC values of HA-CTL-C in solution (Table 1) that follows the same order.

To test if the films can be reused several times as anti-microbial coatings, the growth of *C. albicans* and *S. aureus* was monitored when incubated during 24h in contact with reused PEI-(HA-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> and PEI-(HA-CTL-C/CHI)<sub>30</sub> films, respectively. To this aim, a fresh pathogen suspension was put in contact with the functionalized film. After an incubation of 24h, the supernatant was withdrawn and replaced by a fresh pathogen suspension. After each withdrawal, the  $OD_{620}$  of the supernatant was measured to determine pathogen growth after 24h of incubation. When *C. albicans* suspension in contact with (HA-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> film is renewed every 24h, a complete inhibition is observed at least three times. A slight decrease of the efficiency of (HA-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> film is detectable in presence of a third and a fourth fresh solution of *C. albicans* (Figure 2d). In contrary, *S. aureus* growth is only inhibited about 40% at the second use and not any more at the third one. In parallel, the supernatants were incubated with fresh pathogen suspensions during 24h and the  $OD_{620}$  was also measured (Figure S-5 in SI). No inhibition of growth was observed with both pathogens

---

in the supernatant showing that there is probably no or a weak amount (quite less than the MIC) of CTL-C released in solution.

To clarify the mechanism of HA-CTL-C inhibition, we synthesized fluorescently labeled HA<sup>FITC</sup>-CTL-C and HA<sup>FITC</sup> to analyse their interaction with *C. albicans* when they are solubilised in solution or embedded in multilayer films. Using fluorescently labeled CTL-C, a previous study showed that the peptides penetrate into cell membranes and accumulate inside yeasts<sup>[36, 37]</sup>. After 45 min of incubation at 30°C with HA<sup>FITC</sup> or HA<sup>FITC</sup>-CTL-C in solution, *C. albicans* were observed by CLSM. The fluorescent HA<sup>FITC</sup>-CTL-C was detectable in cytoplasm without provoking cell lysis (Figure 3a). On the contrary, without grafted CTL-C, HA<sup>FITC</sup> is clearly observed all around the yeast cells, stacking probably on the membranes and leading to a honeycomb structure (Figure 3b). This suggests that CTL-C can cross the cell membrane, even when it is grafted, leading to an accumulation of HA inside the cytoplasm. *C. albicans* were thus incubated during 45 min at 30°C in contact with PEI-(HA<sup>FITC</sup>-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> films and then observed by CLSM. When HA<sup>FITC</sup>-CTL-C is embedded inside a PEM film, a strong green fluorescence is observed mainly inside the yeast (Figure 3c). In the case of HA<sup>FITC</sup>/CHI films, *C. albicans* are hardly visible due to the background fluorescence of the film that encapsulates the pathogens. In spite of its insertion into the PEM films, CTL-C allows the penetration of HA<sup>FITC</sup>-CTL-C inside the yeasts explaining the films activity.

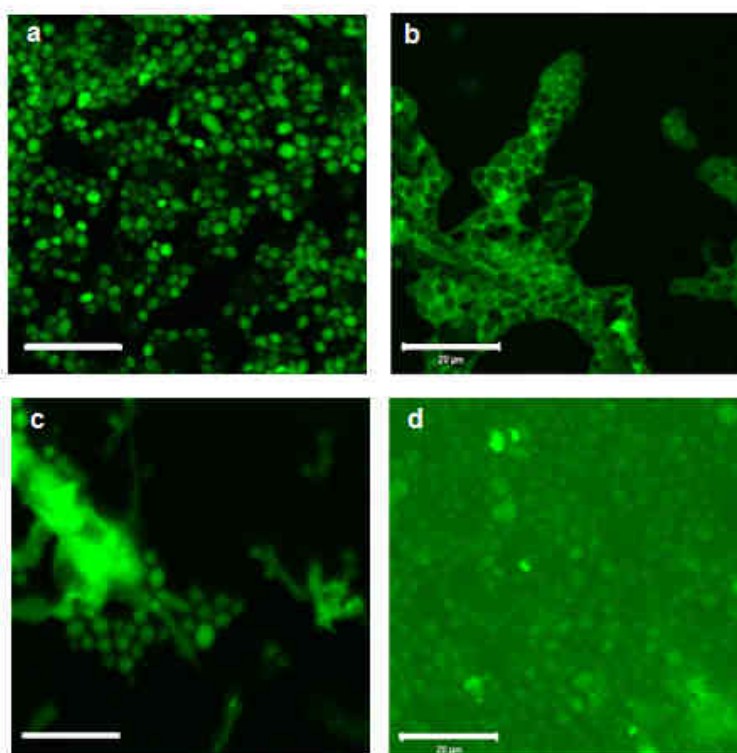


Figure 3: CLSM images of *C. albicans*, after 45 min of incubation, in the presence of (a) HA<sup>FITC</sup>-CTL-C in solution (50 μM in peptide) and (b) HA<sup>FITC</sup> in solution and in contact with (c) PEI-(HA<sup>FITC</sup>-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> and (d) PEI-(HA<sup>FITC</sup>/CHI)<sub>15</sub> multilayer films. The scale bars represent 20 μm.

*M. luteus*, *S. aureus* and *C. albicans* are known to secrete hyaluronidase, a class of enzymes able to hydrolyze HA. We were then interested in following polysaccharide films after contact with bacteria. The cutting of one constitutive partner should lead to the film degradation. Indeed, HA<sup>FITC</sup>/CHI films were degraded when incubated during 24h with *S. aureus* (Figure S-4 in SI). Degradation of HA should release the embedded CTL-C in the supernatant and promotes the contact between CTL-C peptides and the pathogens. This property renders the film specifically active against these pathogens. Pathogens thus initiate their own suicide when brought in contact with HA-CTL-C/CHI film. Even though the HA-CTL-C/CHI film is degraded with time in the presence of pathogens, it can be reused at least four times without losing its activity against *C. albicans*. The activity of a (HA-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> film seems to be due to a specific and low release of the HA-CTL-C in the supernatant. Indeed after 72 h of incubation of *S. aureus* on PEI-(HA-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> film, a low degradation of the

film is visible by CLSM (Figure S-6 in SI). Indeed even if the topography of the films is not changed, the intensity of fluorescence is decreased.

Finally, it is important to ensure that the film is not cytotoxic to healthy wound healing cells. To this aim, the viability of human gingival fibroblasts (HGFs) cultivated on (HA-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> films has been evaluated through their mitochondrial activity, monitored by AlamarBlue™ assays. Already after one day, the metabolic cell activity measured on (HA-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> films is lower compared to HA/CHI films and non-coated glass substrate (Figure S-7 in SI). After 7 days of culture, the number of viable HGFs on HA-CTL-C/CHI films represents 25% of HGFs on CHI/HA films. The proliferation of cells seems to be slowed down. Such behavior would suggest that the multilayers are not cytotoxic. To discriminate between cytotoxic or non-adherent properties, suspended cells from HA-CTL-C/CHI film supernatants were transplanted to fresh culture plates. Even after 24 h of floating, many cells readily attached and spread similarly to healthy cells. Thus, the film (HA-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> is not cytotoxic but seems rather antifouling as it was found for PLL/HA multilayer films<sup>[49]</sup>.

In conclusion, we designed a new surface coating based on polysaccharide multilayer films with a functionalized HA with 5% of CTL-C, a peptide possessing both antibacterial and antifungal properties. Antimicrobial properties of CTL-C are kept when grafted on HA either in solution or when embedded into PEM films. After 24 h of incubation, HA-CTL-C/CHI films can fully inhibit the development of *M. luteus*, *C. albicans* and *S. aureus*, which are common and virulent pathogens agents encountered in nosocomial diseases. The presence of CTL-C peptides on HA allows the penetration of the modified polysaccharide inside *C. Albicans*. The secretion of hyaluronidase from all tested pathogens could be responsible of HA-CTL-C release from the film and for its activity. The film can keep its activity during 4 days against

fresh incubated *C. albicans* suspension. Furthermore, the limited fibroblasts adhesion, without cytotoxicity, on HA-CTL-C/CHI films highlights a medically relevant application to prevent infections on catheters.

**Supporting Information:** Supporting information is available from Wiley Online Library or from the author.

**Acknowledgments:** Christophe Contal is acknowledged for the AFM images in wet state. Karim Benmlih, Mathias Lefort and Joseph Hemmerlé are acknowledged for the automated sprayer development. Bernard Guerold is acknowledged for peptide synthesis. G. C. was supported by a “BDI” doctoral fellowship of the Centre National de la Recherche Scientifique and the Région Alsace. R. A. was supported by the grant from Higher Education Commission (Pakistan). We acknowledge the Pôle Matériaux et Nanosciences d'Alsace (PMNA) (“Jeunes Chercheurs du PMNA 2009” grant) and the Faculty of Dentistry of the University of Strasbourg for financial contribution.

## References

- [1] J. P. Guggenbichler, O. Assadian, M. Boeswald, A. Kramer, *GMS Krankenhauhygiene Interdisziplinär* 2011, 6, 1.
- [2] R. Katneni, S. S. Hedayati, *Nat Clin Pract Nephrol* 2007, 3, 256.
- [3] M. M. Harriott, M. C. Noverr, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53, 3914.
- [4] M. E. Shirtliff, B. M. Peters, M. A. Jabra-Rizk, *FEMS Microbiol. Lett.* 2009, 299, 1.
- [5] E. Carlson, *Infect. Immun.* 1983, 42, 285.
- [6] S. A. Klotz, B. S. Chasin, B. Powell, N. K. Gaur, P. N. Lipke, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007, 59, 401.
- [7] G. Ramage, J. P. Martinez, J. L. Lopez-Ribot, *Fems Yeast Res* 2006, 6, 979.
- [8] A. Lupetti, R. Danesi, M. Campa, M. Del Tacca, S. Kelly, *Trends Mol Med* 2002, 8, 76.
- [9] I. Banerjee, R. C. Pangule, R. S. Kane, *Adv Mater* 2011, 23, 690.
- [10] K. Glinel, P. Thebault, V. Humblot, C. M. Pradier, T. Jouenne, *Acta Biomater* 2012, 8, 1670.
- [11] G. Decher, *Science* 1997, 277, 1232.
- [12] V. Gribova, R. Auzely-Velty, C. Picart, *Chem. Mater.* 2012, 24, 854.
- [13] J. H. Dai, M. L. Bruening, *Nano Letters* 2002, 2, 497.
- [14] J. H. Fu, J. Ji, D. Z. Fan, J. C. Shen, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2006, 79A, 665.

- [15] Z. Shi, K. G. Neoh, S. P. Zhong, L. Y. Yung, E. T. Kang, W. Wang, *J Biomed Mater Res A* 2006, 76, 826.
- [16] D. Lee, R. E. Cohen, M. F. Rubner, *Langmuir* 2005, 21, 9651.
- [17] Z. Li, D. Lee, X. X. Sheng, R. E. Cohen, M. F. Rubner, *Langmuir* 2006, 22, 9820.
- [18] D. Lee, M. F. Rubner, R. E. Cohen, *Chem. Mater.* 2005, 17, 1099.
- [19] P. M. Nguyen, N. S. Zacharia, E. Verploegen, P. T. Hammond, *Chem. Mater.* 2007, 19, 5524.
- [20] M. Malcher, D. Volodkin, B. Heurtault, P. Andre, P. Schaaf, H. Mohwald, J. C. Voegel, A. Sokolowski, V. Ball, F. Boulmedais, B. Frisch, *Langmuir* 2008, 24, 10209.
- [21] J. H. Fu, J. Ji, W. Y. Yuan, J. C. Shen, *Biomaterials* 2005, 26, 6684.
- [22] S. Bratskaya, D. Marinin, F. Simon, A. Synytska, S. Zschoche, H. J. Busscher, D. Jager, H. C. van der Mei, *Biomacromolecules* 2007, 8, 2960.
- [23] H. F. Chuang, R. C. Smith, P. T. Hammond, *Biomacromolecules* 2008, 9, 1660.
- [24] S. Pavluchina, Y. M. Lu, A. Patimetha, M. Libera, S. Sukhishvili, *Biomacromolecules* 2010, 11, 3448.
- [25] J. Verran, K. Whitehead, *Int. J. Artif. Organs* 2005, 28, 1138.
- [26] K. Bruellhoff, J. Fiedler, M. Moller, J. Groll, R. E. Brenner, *Int. J. Artif. Organs* 2010, 33, 646.
- [27] O. Etienne, C. Picart, C. Taddei, Y. Haikel, J. L. Dimarcq, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. A. Ogier, C. Egles, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 3662.
- [28] A. Shukla, K. E. Fleming, H. F. Chuang, T. M. Chau, C. R. Loose, G. N. Stephanopoulos, P. T. Hammond, *Biomaterials* 2010, 31, 2348.
- [29] A. Guyomard, E. De, T. Jouenne, J. J. Malandain, G. Muller, K. Glinel, *Adv. Funct. Mater* 2008, 18, 758.
- [30] A. J. Karlsson, R. M. Flessner, S. H. Gellman, D. M. Lynn, S. P. Palecek, *Biomacromolecules* 2010, 11, 2321.
- [31] O. Etienne, C. Gasnier, C. Taddei, J. C. Voegel, D. Aunis, P. Schaaf, M. H. Metz-Boutigue, A. L. Bolcato-Bellemin, C. Egles, *Biomaterials* 2005, 26, 6704.
- [32] R. Prucek, J. Tucek, M. Kilianova, A. Panacek, L. Kvitek, J. Filip, M. Kolar, K. Tomankova, R. Zboril, *Biomaterials* 2011, 32, 4704.
- [33] D. Botequim, J. Maia, M. M. F. Lino, L. M. F. Lopes, P. N. Simoes, L. M. Ilharco, L. Ferreira, *Langmuir* 2012, 28, 7646.
- [34] F. X. Hu, K. G. Neoh, L. Cen, E. T. Kang, *Biotechnol. Bioeng.* 2005, 89, 474.
- [35] J. J. H. Oosterhof, K. J. D. A. Buijssen, H. J. Busscher, B. F. A. M. van der Laan, H. C. van der Mei, *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 3673.
- [36] J. Briolat, S. D. Wu, S. K. Mahata, B. Gonthier, D. Bagnard, S. Chasserot-Golaz, K. B. Helle, D. Aunis, M. H. Metz-Boutigue, *Cell. Mol. Life Sci.* 2005, 62, 377.
- [37] P. Shooshtarizadeh, D. Zhang, J. F. Chich, C. Gasnier, F. Schneider, Y. Haikel, D. Aunis, M. H. Metz-Boutigue, *Regul. Pept.* 2010, 165, 102.
- [38] R. Aslam, M. Atindehou, T. Lavaux, Y. Haikel, F. Schneider, M.-H. Metz-Boutigue, *Curr. Med. Chem.* 2012, ASAP.
- [39] T. Serizawa, M. Yamaguchi, M. Akashi, *Macromolecules* 2002, 35, 8656.
- [40] E. J. Menzel, C. Farr, *Cancer Lett.* 1998, 131, 3.
- [41] N. Volpi, J. Schiller, R. Stern, L. Soltes, *Curr. Med. Chem.* 2009, 16, 1718.
- [42] R. Riva, H. Ragelle, A. des Rieux, N. Duhem, C. Jerome, V. Preat, *Adv Polym Sci* 2011, 244, 19.
- [43] E. A. Larkin, R. J. Carman, T. Krakauer, B. G. Stiles, *Curr. Med. Chem.* 2009, 16, 4003.

- [44] M. T. Shimizu, N. Q. Almeida, V. Fantinato, C. S. Unterkircher, *Mycoses* 1996, 39, 161.
- [45] CLSI, *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards 8th version*. CLSI document M07-A8, Clinical and laboratory standards institute, Wayne, PA 2009.
- [46] M. V. Voinova, M. Rodahl, M. Jonson, B. Kasemo, *Phys. Scr.* 1999, 59, 391.
- [47] C. Picart, P. Lavalley, P. Hubert, F. J. G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel, *Langmuir* 2001, 17, 7414.
- [48] F. Boulmedais, V. Ball, P. Schwinté, B. Frisch, P. Schaaf, J.-C. Voegel, *Langmuir* 2003, 19, 440.
- [49] L. Richert, F. Boulmedais, P. Lavalley, J. Mutterer, E. Ferreux, G. Decher, P. Schaaf, J.-C. Voegel, C. Picart, *Biomacromolecules* 2004, 5, 284.
- [50] R. B. Merrifield, *Science* 1965, 150, 178.
- [51] M. H. Metz-Boutigue, Y. Goumon, K. Lugardon, J. M. Strub, D. Aunis, *Cell. Mol. Neurobiol.* 1998, 18, 249.
- [52] D. Sizova, E. Charbaut, F. Delalande, F. Poirier, A. A. High, F. Parker, A. Van Dorselaer, M. Duchesne, A. Diu-Hercend, *Neurobiol. Aging* 2007, 28, 357.
- [53] S. T. Wall, K. Saha, R. S. Ashton, K. R. Kam, D. V. Schaffer, K. E. Healy, *Bioconjug. Chem.* 2008, 19, 806.
- [54] G. Cado, H. Kerdjoudj, A. Chassepot, M. Lefort, K. Benmlih, J. Hemmerle, J. C. Voegel, L. Jierry, P. Schaaf, Y. Frere, F. Boulmedais, *Langmuir* 2012, 28, 8470.
- [55] P. Bulet, J. L. Dimarcq, C. Hetru, M. Lagueux, M. Charlet, G. Hegy, A. Vandorselaer, J. A. Hoffmann, *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 14893.
- [56] M. H. Wu, R. E. W. Hancock, *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 29.
- [57] D. Y. Lee, C. M. Huang, T. Nakatsuji, D. Thiboutot, M. Monestier, R. L. Gallo, *J. Invest. Dermatol.* 2009, 129, S7.
- [58] K. Lugardon, S. Chasserot-Golaz, A. E. Kieffer, G. Maget-Dana, G. Nullans, B. Kieffer, D. Aunis, M. H. Metz-Boutigue, *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 35875.
- [59] B. Page, M. Page, C. Noel, *Int. J. Oncol.* 1993, 3, 473.
- [60] S. L. Voytik-Harbin, A. O. Brightman, B. Waisner, C. H. Lamar, S. F. Badylak, *In Vitro Cell Dev-An* 1998, 34, 239.

#### 4. Informations supplémentaires du projet d'article

##### Abbreviations

##### 1. Preparation and analysis of antimicrobial peptides

##### 2. Preparation of modified HA

2.1. Preparation of HA-CTL-C

2.2. Preparation of HA<sup>FITC</sup>

2.3 Preparation of HA<sup>FITC</sup>-CTL-C

##### 3. PEM Films buildup

3.1. Polysaccharide solutions

3.2. Film buildup

##### 4. Physico-chemical characterizations

4.1 Quartz crystal microbalance

4.2 Atomic Force Microscopy

4.3 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

##### 5. Bacterial and fungal assays

5.1. Bacterial and fungal growth

5.2. CLSM experiments

##### 6. Human gingival fibroblasts viability assays

##### 7. Supplementary Figures

Figure S-1

Figure S-2

Figure S-3

Figure S-4

Figure S-5

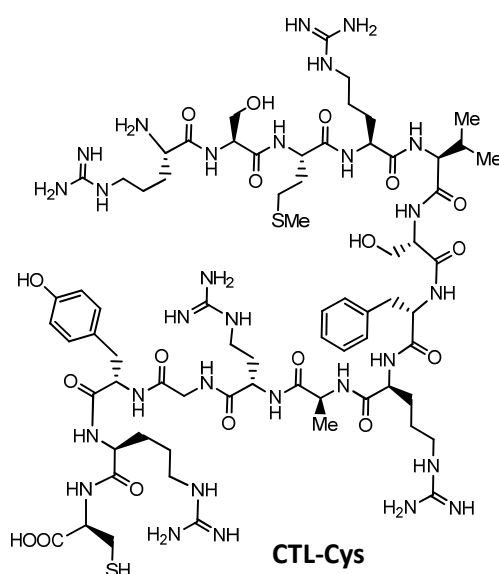
Figure S-6

Figure S-7



**Abbreviations** : AMP = antimicrobial peptides, CGA<sub>344-358</sub> = chromogranin A 344-358; CTL = cateslytin; CHI = chitosan; CTL-C = cateslytin with a cysteine in C terminal; HA = hyaluronic acid; EDC = N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride ; sulfo-NHS = N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt ; HEPES = 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid ; TCEP = tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride ; Ct=C-terminal ; Da=dalton ; tBuOH=tertio-butanol ; DS=substitution degree ; NMR= nuclear magnetic resonance ; MHz = megahertz ; ppm = parts per million ; Cys = cysteine ; Phe = Phenylalanine ; Tyr = Tyrosine ; br = broad ; s = singlet; d = doublet; m = multiplet.

### 1. Preparation and analysis of synthetic antimicrobial peptides.



The synthetic peptide corresponding to bovine CGA (Uniprot P05059), named CTL, (CGA344-358: RSMRLSFRARGYGFR) was synthesized with a Cysteine at the C-terminal end (CTL-C) on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer (Courtaboeuf, France) using the stepwise solid-phase approach with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry<sup>[50]</sup>. After purification by a Dionex HPLC system (Ultimate 3000; Sunnyvale, CA USA) on a Macherey Nagel Nucleosil RP 300-5C18 column (10 × 250 mm; particle size 5 μm and pore size 100

nm), the peptide was analysed by mass spectrometry (MALDI-TOF) and automated Edman sequencing on an Applied Sequencing System Procise (Applied Biosystems, Foster City, USA)<sup>[51]</sup>. MALDI mass measurements were carried out on an Ultraflex™ TOF/TOF (BrukerDaltonics, USA) to perform a rapid control of synthetic peptides according to the procedure previously reported<sup>[52]</sup>.

## **2. Preparation of modified HA.**

Peptide and FITC functionalized HA, i.e. HA-CTL-C, HA<sup>FITC</sup> and HA<sup>FITC</sup>-CTL-C, have been prepared according to the following general synthetic pathway described below.

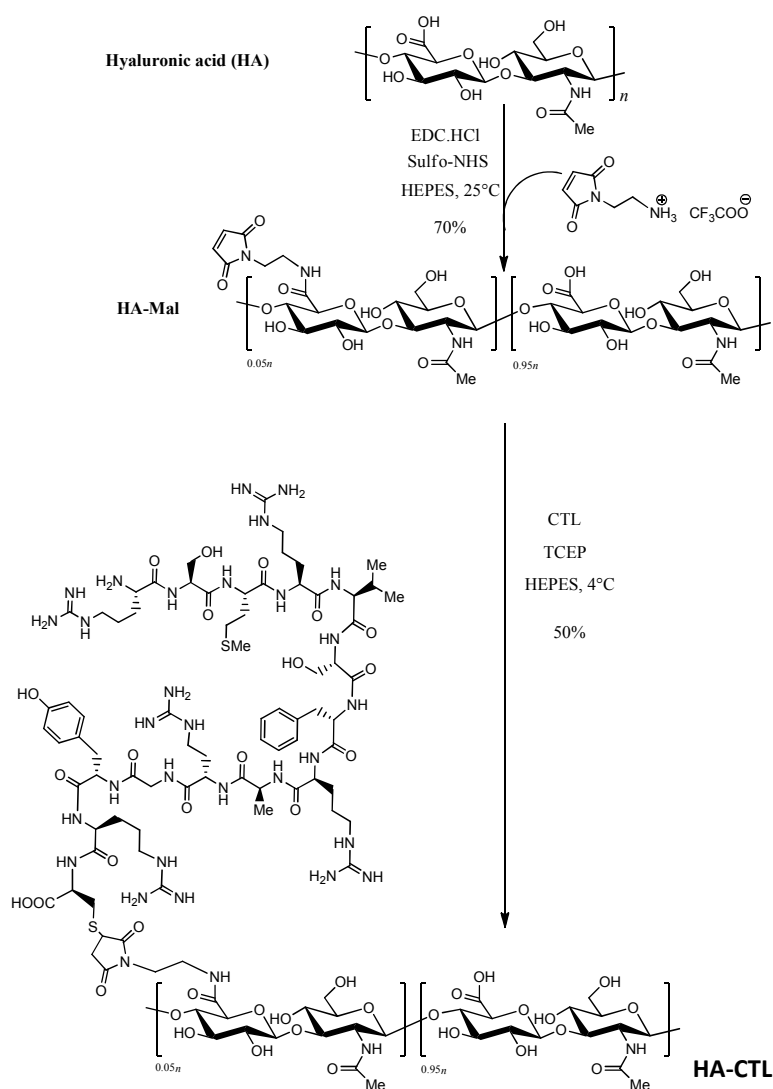
### *2.1. Preparation of HA-CTL-C*

Hyaluronic acid (HA) 420 000 Da, was functionalized with maleimide group according to previously reported method<sup>[53]</sup>. HA (100.9 mg) was dissolved in 15 mL of 0.01M HEPES buffer (pH 6). To this solution, EDC (35.2 mg) and sulfo-NHS (10.2 mg) were added and the resulting mixture was stirred 2 hours at room temperature. Afterwards, N-(2-aminoethyl) maleimide trifluoroacetate salt (6.7 mg) was added to the reaction mixture and let stirred during 20 hours. The mixture was dialyzed (cut-off 12 000-14 000 Da) first against 0.5 M NaCl during one day and Milli-Q® water during 6 days. Water was changed every day. HA-Mal (86 mg) was obtained as a white solid after freeze-drying. By <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O), was determined the degree of substitution (DS) of HA-Mal, defined as the number of maleimide groups per 100 disaccharide units of HA.

All spectra were realized in D<sub>2</sub>O containing 5% of tBuOH: the singlet of the t-butyl group of tBuOH was calibrated at  $\delta$  1.24 ppm and thus used as internal reference. The singlet at  $\delta$  7.1 ppm was assigned to the two symmetric protons on the double bond of the maleimide group. By comparing the integration of this signal with the singlet at  $\delta$  2.0 ppm,

assigned to the methyl protons of the acetamide group, the DS was determined equivalent to 5%.

$^1\text{H NMR}$  (D<sub>2</sub>O, 400MHz,  $\delta$  ppm):  $\delta$  6.9 (s, maleimide), 4.5 (br d, HA), 3.5 (m), 2.0 (s, acetyl group of HA).

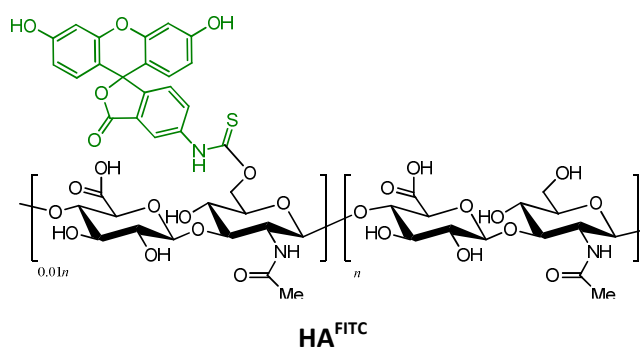


The coupling reaction between HA-Mal 5% (80 mg) and CTL-C (10.1 mg) was performed at 4°C during 20 h in 16mL of 0.01M HEPES buffer (pH 6) and 50  $\mu\text{M}$  of TCEP. Then, the mixture was dialysed (cut-off 50 000Da) against 0.5 M NaCl during one day and Milli-Q® water during 6 days. Water was changed every day. Peptide-conjugated HA, named HA-CTL-C, was freeze dried to provide a white solid with 80-85% of overall yield (~79 mg).

The DS, defined as the number of CTL-C peptide per 100 disaccharide units of HA, was determined by  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz). All aromatic signals between  $\delta$  7.0 and 7.5 ppm corresponding to the protons of the aminoacids Phe and Tyr were compared to the singlet at  $\delta$  2.0 ppm (assigned as the methyl group of the acetamide). A DS of 5% is determined.

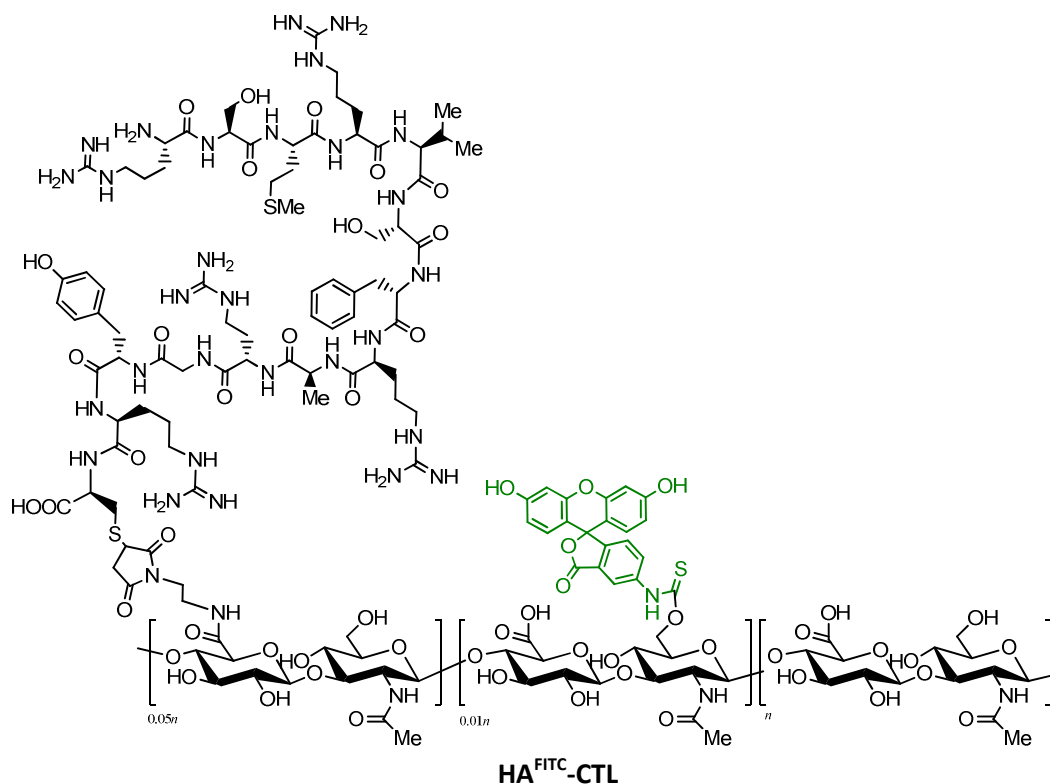
$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400MHz,  $\delta$  ppm): 7.35 (br s, Ar aminoacid of CTL-C), 7.25 (br s, Ar aminoacid of CTL-C), 7.10 (br s, Ar aminoacid of CTL-C), 6.85 (br s, Ar aminoacid of CTL-C), 4.50 (br s, HA), 4.40 (br s, CTL-C), 3.10 (br s, CTL-C), 2.50 (br s, CTL-C), 2.00 (s, methyl from acetyl group of HA), 1.75 (br s, CTL-C), 0.95 (br s, CTL-C).

## 2.2. Preparation of $\text{HA}^{\text{FITC}}$



Fluorescein Isothiocyanate (FITC) has been covalently attached to HA according to the following procedure: a solution of FITC (41  $\mu\text{mol}$  dissolved in 2 mL of DMSO) and a solution of HA (0.31  $\mu\text{mol}$  dissolved in 18 mL of deionized water) were mixed. The resulting solution was then adjusted at pH 9 by using a 0.01M NaOH solution. The reaction mixture was stirred for 12 h at room temperature. Then, 40 mL of deionized water was added and this final mixture was dialyzed (cut-off: 12 000 – 14 000 Da) against deionized water until no absorbance is detected in the water ( $\lambda = 494\text{nm}$ ). The obtained compound is a yellowish solid and corresponds to HA-functionalized with 1% of fluorescein. The  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) spectra of  $\text{HA}^{\text{FITC}}$  is identical to the non-modified HA.

### 2.3. Preparation of HA<sup>FITC</sup>-CTL-C



HA<sup>FITC</sup>-CTL-C polymer has been prepared from HA-Mal. This polymer was labeled with 1% FITC as described above to provide HA<sup>FITC</sup>-Mal. Then, CTL-C peptide reacted with free maleimide group to lead to HA<sup>FITC</sup>-CTL-C as a yellow solid. The procedure used to get HA<sup>FITC</sup>-CTL-C was identical to the one described above to prepare HA-CTL-C. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) spectra of HA<sup>FITC</sup>-CTL-C was identical to the spectra of HA-CTL-C.

## 3. PEM films buildup

### 3.1. Polysaccharide solutions

Chitosan (CHI, PROTASAN Ultrapure Chitosan CL213, 260 000 g/mol, DA 83 %) was purchased by Novamatrix (Sandvika, Norway). Dried Sodium Hyaluronate (HA, 420 000 g/mol) was purchased by Lifecore (Chaska, USA). Poly(ethylene imine) (PEI, 60 000 g/mol, 50% in water), sodium chloride, sodium dodecyl sulfate (SDS), HCl and NaOH were

purchased by Sigma-Aldrich (Quentin-Fallavier, France). All products were used without further purification. 150 mM NaCl solution was prepared with Ultrapure Milli-Q<sup>®</sup> water having a resistivity of 18.2 M $\Omega$ .cm. CHI and HA solutions were prepared at 0.3 mg/mL in 150 mM NaCl adjusted at pH 4 with NaOH or HCl solutions. HA-CTL-C and HA<sup>FITC</sup>-CTL-C solutions were prepared at 0.2 mg/mL and 0.1 mg/mL, respectively. PEI solution was prepared at 0.5 mg/mL in 150 mM NaCl solution adjusted at pH 7.5 with NaOH or HCl solutions.

### 3.2. Film buildup

Before PEM buildup, glass coverslips ( $\varnothing = 14$  mm; VWR, Strasbourg, France) were cleaned in a SDS solution at  $10^{-2}$  M, ultrasonicated during 5 min and then submitted to a hot 0.1 M HCl solution during 10 min and finally rinsed with ultrapure Milli-Q<sup>®</sup> water. The precursor PEI layer and CHI/HA films were deposited by using an automated spraying device described in a previous work<sup>[54]</sup>. CHI/HA-CTL-C and CHI/HA<sup>FITC</sup>-CTL-C films have been prepared in 24 wells plates on PEI precoated glass substrates. 300  $\mu$ L of the polycation solution were deposited for 5 min on glass coverslips followed by a rinsing step (500  $\mu$ L) with ultra Milli-Q<sup>®</sup> water. Then, 300  $\mu$ L of polyanion solution were deposited for 5 min followed by a rinsing step (500  $\mu$ L) with ultra Milli-Q<sup>®</sup> water. To test the antimicrobial activity of PEM films depending of the number of HA-CTL-C layers, PEI-[HA/CHI]<sub>15-n</sub>[HA-CTL-C/CHI]<sub>n</sub> with n equal to 0, 5, 10 and 15 and PEI-[HA-CTL-C/CHI]<sub>30</sub> films were built.

## 4. Physico-chemical characterization

### 4.1. Quartz Crystal Microbalance

The construction of multilayer films was monitored in situ by quartz crystal microbalance (QCM) (Q-Sense E4, Göteborg, Sweden). The measurement methodology was addressed in details elsewhere<sup>[48]</sup>. Briefly after cleaning by UV-ozone treatment (15 min)

followed by a rinsing with Milli-Q® water and a drying with nitrogen, the QCM crystal was put in the measurement cell in contact with Milli-Q® water. After stabilization of the signals, 600 µL of the polycation solution were injected, left in the cell for 5 min, and rinsed with the Milli-Q® water and left again for 5 min. The same procedure was used for the deposition of the polyanion. The frequency shifts were recorded during the whole process. A negative value of  $\Delta f_\nu$  (or of the normalized shift  $\Delta f_\nu/\nu$ ) reveals a decrease of the resonance frequency during the deposition process that corresponds to an increase of the mass adsorbed.

#### *4.2. Atomic Force Microscopy (AFM)*

Atomic force microscopy measurements (AFM) were realized with a Veeco Multimode Nanoscope IIIA (Digital Instrument) in liquid state with the PeakForce Tapping® mode (Bruker) using cantilevers with a spring constant of 3 N/m.

#### *4.3. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)*

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) observations were carried out with a Zeiss LSM-510 microscope using a 40x/1.31.4 oil immersion objective and a 0.43-mm z-section interval. FITC fluorescence was detected upon excitation at 488 nm, through a cut-off dichroic mirror and an emission bandpass filter of 505–530 nm (green).

### **5. Bacterial and fungal assays**

#### *5.1 Bacterial and fungal growth*

To determine the antibacterial activity, microdilution assay was used on two bacterial strains *M. luteus* (A270) and *S. aureus* (ATCC25923). The antifungal activity was tested against one yeast strain *C. albicans*. Bacteria were precultured aerobically in Mueller-Hinton (MH) broth (Merck, Darmstadt, Germany) with shake up at 37°C for 18 h. *C. albicans*

preculture was carried out on a Sabouraud Broth (SB) medium (BioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France) with shake up at 30°C for 24 h. The antimicrobial activity was tested using a mid-logarithmic-phase culture of bacteria or yeast with an initial optical density at 620 nm ( $OD_{620}$ ) of 0.001. For the tests performed in solution, aqueous CTL-C and HA-CTL-C solutions were prepared in bacterial or yeast medium. Aliquots of CTL-C or HA-CTL-C (10  $\mu$ L) were incubated in 96-well microplates (Falcon, Becton Dickinson, USA) with 90  $\mu$ L of bacteria or yeast at final concentrations of 100  $\mu$ M to 2  $\mu$ M in peptide. After 24 h of incubation at 37°C under gentle stirring, the  $OD_{620}$  of the 96-well plate was measured by a microplate reader<sup>[55, 56]</sup>. MIC is the minimal concentration inhibiting bacterial or fungal growth. To test the antibacterial and antifungal properties of the multilayer films, PEI-(HA/CHI)<sub>15-n</sub>-(HA-CTL-C/CHI)<sub>n</sub> with n = 0, 5, 10 and 15 and PEI-(HA-CTL-C/CHI)<sub>30</sub> films were prepared. 400  $\mu$ L of a mid-logarithmic-phase culture of bacteria or yeast with  $OD_{620}$  of 0.001 were placed in 24-well plate containing multilayer films. For each tested film, 100  $\mu$ L of the supernatant was taken to measure the  $OD_{620}$  of the supernatant by a microplate reader. The withdrawn volume was compensated with the appropriated fresh bacteria or yeast solution of the same measured  $OD_{620}$ . Intermittent controls were performed by inoculating the culture medium on MH (resp. SB) agar plates by spreading method and counting colonies for verification at different steps. Several controls were used: fresh medium without inoculation of pathogens was used to ensure sterility, mixture of Tetracycline (10  $\mu$ g/mL) and Cefotaxime (0.1  $\mu$ g/mL) were used as positive control (90  $\mu$ L of culture and 10  $\mu$ L of antibiotics) and fresh inoculated culture medium without any addition was taken as negative control. For the bacterial and yeast quantification, a conversion factor was devised to convert OD into bacterial and yeast counting, respectively. Briefly, OD of fresh bacteria (resp. yeast) culture was measured at 620 nm and was plated to MH (resp. SB) agar for 24 h at 37°C (resp. 30°C). Colony count was



performed and plotted versus the  $OD_{620}$  and the gradient of the linear line was taken as conversion factor. Pathogen quantification (colony forming unit (CFU) per mL) was performed at time zero and then after each hour for 6 h and then finally at 24 h. For quantification, conversion factors were determined for each strain used separately<sup>[57]</sup>. Each assay was performed in triplicate and the experiments were repeated minimum three times.

The normalized growth of pathogens (in %) was estimated by comparing the  $OD_{620}$  values of in the presence of multilayer films and the positive and the negative control. The  $OD_{620}$  value of control cultures growing in the absence of films and antibiotics was taken as 100% growth (negative control) and the  $OD_{620}$  value of cultures growing in the presence of antibiotics (Tetracycline and Cefotaxime) was taken as 0% growth (positive control). To this aim, the following equation was used:

$$\text{Normalized pathogen growth (\%)} = \frac{(OD_{620, \text{sample}} - OD_{620, \text{positive control}})}{(OD_{620, \text{negative control}} - OD_{620, \text{positive control}})} \times 100$$

To follow the interaction of fluorescently labeled HA<sup>FITC</sup>-CTL-C in solution and HA<sup>FITC</sup>-CTL-C/CHI films with *C. albicans*, CLSM was used a protocol previously described with few modifications<sup>[58]</sup>. Briefly for experiments done with HA<sup>FITC</sup>-CTL-C in solution, Poly-L-Lysine coated microscopic slides were covered with fresh medium containing *C. albicans* ( $OD_{620} = 0.001$ ) in SB culture medium and incubated during 24 h at 30°C without shake up. The medium was then removed and replaced by 50  $\mu\text{M}$  (in peptide) of HA<sup>FITC</sup>-CTL-C. After an incubation period of 45 min, the slides were washed with fresh culture medium and subsequently treated for 30 min with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.3. After several rinsings with PBS, slides were covered with Moviol 4-88 (Aldrich, Steinheim, Germany). For experiments done with HA<sup>FITC</sup>-CTL-C/CHI, fresh *C. albicans*

medium, previously incubated at  $OD_{620} = 0.001$  in SB culture medium during 24 h at 30°C without shake up, was put in contact with PEI-(HA<sup>FITC</sup>-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> films during 45 min at 30°C without shake up. HA<sup>FITC</sup> in solution and HA<sup>FITC</sup>/CHI films were used as control. *C. albicans* were subjected to optical serial sectioning (0.2-0.3 µm) to produce image in the x-y plane. Each optical section was scanned several times to obtain an average image. Images were recorded digitally in a 768 x 576 pixel format.

### **6. Human gingival fibroblasts viability assays**

The biocompatibility of films was tested using Human gingival fibroblasts (HGFs). HGFs were extracted from human gingival connective tissue of healthy individuals according to a protocol approved by the ethics committee for patient protection of CPP Strasbourg Hospitals. Cells were grown in DMEM containing, 1g/L of glucose and supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 IU/mL penicillin-streptomycin (all from Gibco®). Cells were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in 75 cm<sup>2</sup> flasks. HGF were used between the 6<sup>th</sup> and the 9<sup>th</sup> passage. Before cell seeding, glass coverslips (∅ = 14 mm) coated with different architectures were irradiated by UV for 15 min. Then HGFs were seeded at  $3 \times 10^4$  cells per cm<sup>2</sup> and cultivated at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere for different culture times (Day 1, Day 2 and Day 7).

Cell viability was assessed by AlamarBlue<sup>TM</sup> assay (Biosource International). This assay is based on the reduction of the blue, non-fluorescent resazurin dye to the pink and fluorescent resorufin dye by living cells<sup>[59]</sup>. The overall conversion rate is proportional to the metabolic activity of living cells<sup>[60]</sup>. Viability was assessed for different times 1, 2 and 7 days. After rinsing, cells with PBS, 10% reagent in DMEM were incubated for 2 h. After incubation optical density (OD) at 570 nm and 630 nm were determined with a microplate reader. The

percentage of reduction of AlamarBlue™ was calculated according to the procedure provided by the manufacturer. The experiments were performed in triplicate.

### 7. Supplementary Figures

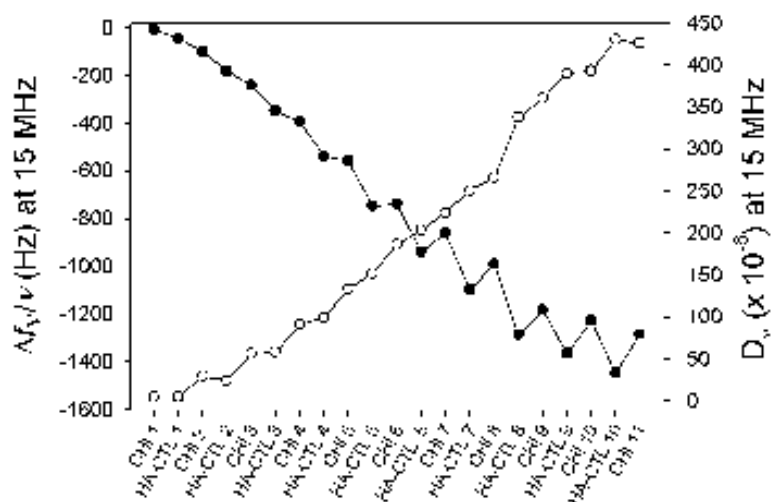


Figure S-1 : Evolution of the normalized frequency shift and the dissipation value of CHI/HA-CTL-C multilayer film, measured at 15 MHz by QCM-D, as a function of the deposited layer. The film was built in 150 mM NaCl at pH 4.

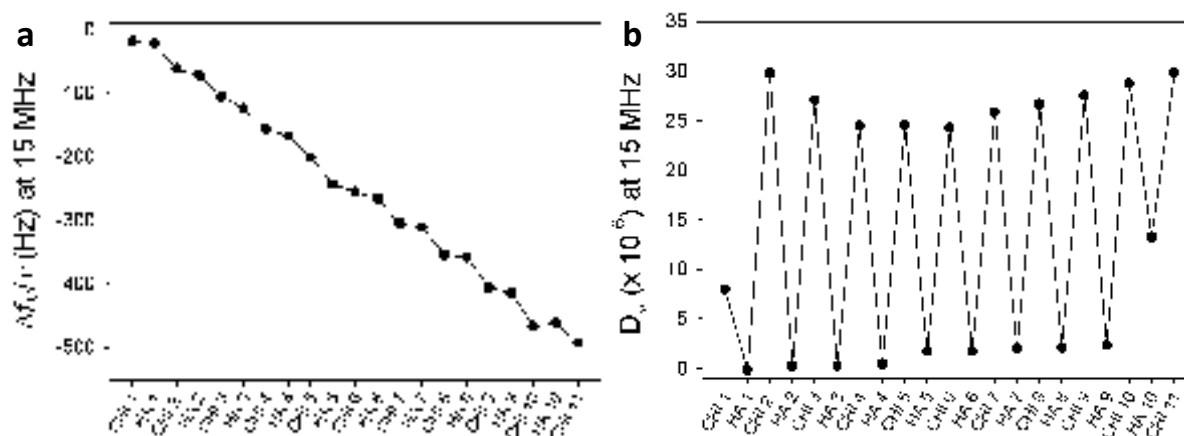


Figure S-2: Evolution of the (a) normalized frequency shift and (b) dissipation of CHI/HA multilayer film, measured by QCM-D at 15 MHz, as function of the deposited layer. The film was built in 150 mM NaCl at pH 4.

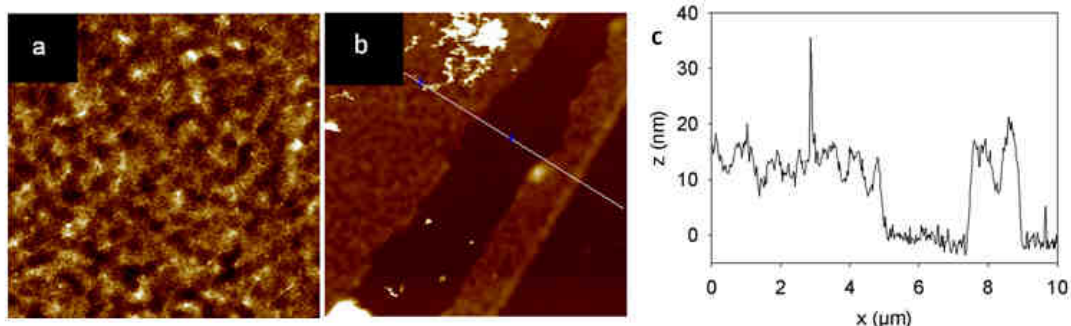


Figure S-3: AFM images obtained in PeakForce Tapping® mode in wet state, of PEI-[HA/CHI]<sub>10</sub> multilayer film: (a) non-scratched (5×5 μm<sup>2</sup>, z scale 200 nm) and (b) scratched (10×10 μm<sup>2</sup>, z scale 85 nm) and (c) its profilometric profile. The film was built in 150 mM NaCl at pH 4.

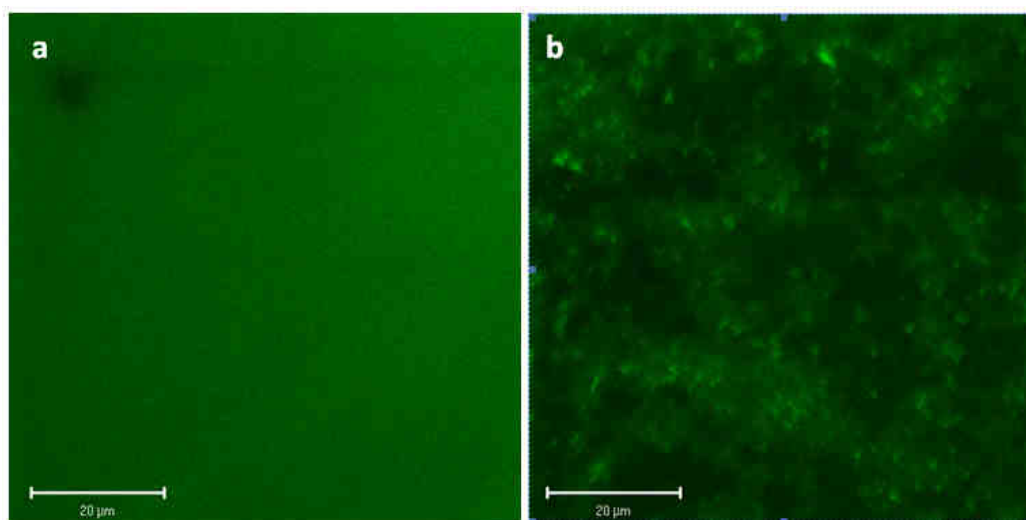


Figure S-4: Confocal images of PEI-(HA<sup>FITC</sup>/CHI)<sub>15</sub> (a) before and (b) after 24h of incubation with *S. aureus*. The images were monitored with the same laser power and microscope parameters.

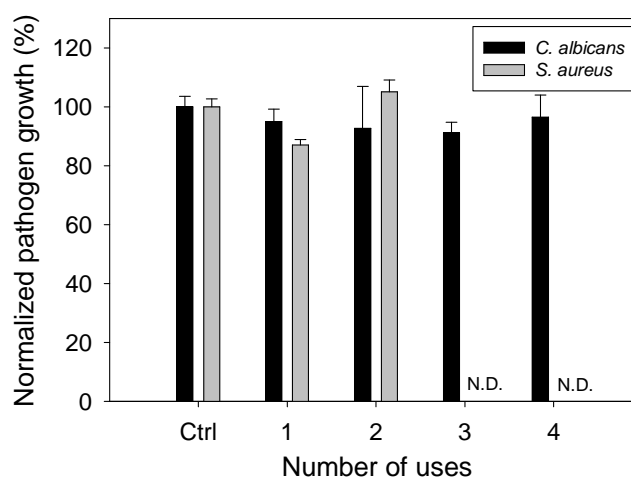


Figure S-5: Normalized growth of *C. albicans* (black) and *S. aureus* (grey) in contact with the supernatant withdrawn from respectively PEI-(HA-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> and PEI-(HA-CTL-C/CHI)<sub>30</sub> films used in Figure 2d. Every 24h, the film was put in contact with a fresh pathogen suspension. After 24h of incubation with the film, the supernatant was withdrawn and incubated during 24h with a fresh pathogen suspension. The normalization was performed with respect to OD<sub>620</sub> measured in the absence of film and antibiotics taken as 100% growth and in the presence of antibiotic taken as 0% growth. ND means not determined.

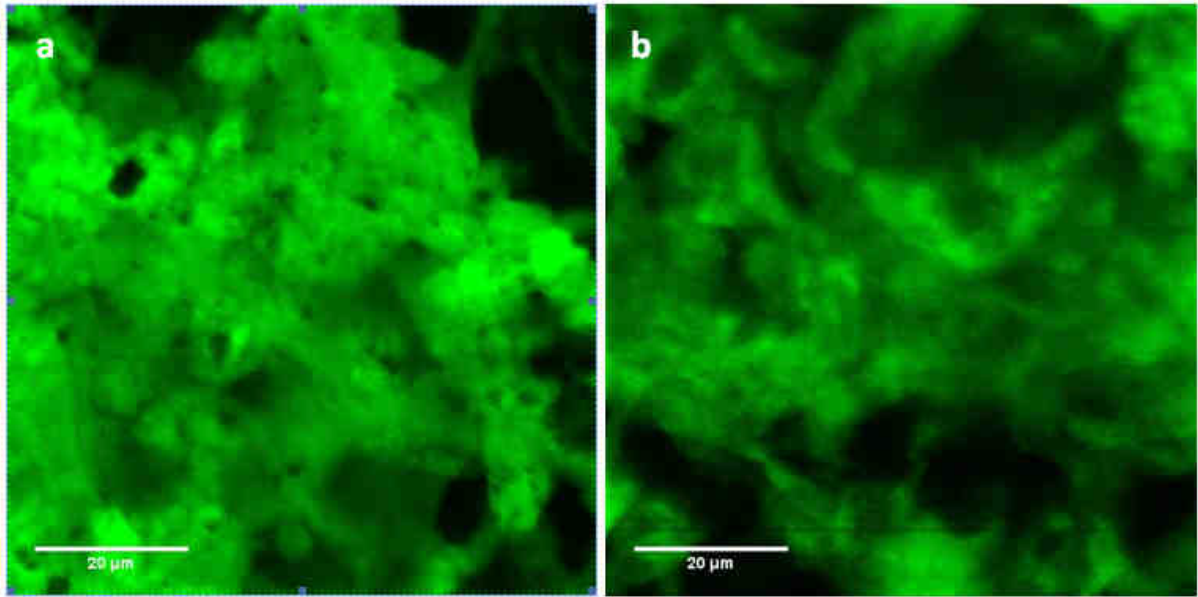


Figure S-6: Confocal images of PEI-(HA<sup>FITC</sup>-CTL-C/CHI)<sub>15</sub> (a) before and (b) after 72 h of incubation with *S. aureus*. The images were monitored with the same laser power and microscope parameters.

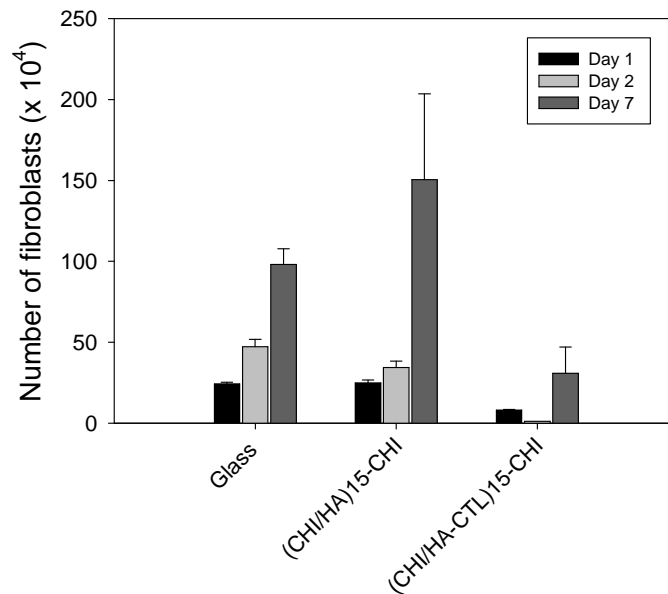


Figure S-7: Viability of HGFs, evaluated by metabolic activity of cells, cultured on (CHI/HA)<sub>15</sub>-CHI and (CHI/HA-CTL)<sub>15</sub>-CHI films built on glass substrates. Cell viability was determined by AlamarBlue<sup>TM</sup> assays after 1, 2, 7 days of culture. The values represent the mean and the standard deviation of three films.

## 5. Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre qu'il était possible de construire de nouveaux revêtements de polysaccharides antibactériens et antifongiques par fonctionnalisation avec un PAMs.

La fonctionnalisation de ces films a été réalisée par l'utilisation de HA greffé à 5% par un peptide antibactérien et antifongique, la cateslytine. Les propriétés de ce peptide sont conservées en solution, greffé sur HA et lorsqu'il est incorporé dans les multicouches HA-CTL/CHI. Ces revêtements empêchent la prolifération après 24h d'incubation à leur contact de *M. luteus*, *C. albicans* and *S. aureus*, pathogènes parmi les plus communs et virulents responsables des maladies nosocomiales.

Le mécanisme d'action des films HA-CTL/CHI a été établi. La présence de la cateslytine sur le polymère permet à celui-ci de pénétrer et de s'accumuler dans *C. Albicans*. Tous les pathogènes utilisés dans cette étude produisent de la hyaluronidase qui peut être responsable de la dégradation du film, de la libération de HA-CTL et donc de l'activité de ces revêtements. Malgré cette dégradation, le film reste actif pendant 4 jours contre *C. Albicans*. Enfin, la non cytotoxicité des films HA-CTL/CHI et la faible adhésion des fibroblastes permet d'envisager des applications médicales efficaces contre le développement d'infection, en particulier lors de la pose de cathéter.

---

## Conclusion générale et perspectives

Le concept des films multicouches, basé sur l'adsorption alternée de polyanions et de polycations, ouvre une nouvelle voie de fonctionnalisation des biomatériaux, notamment par l'utilisation de la pulvérisation qui permet de diminuer significativement le temps de construction de tels films. Une première partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude des complexes CHI/HA et à leur recouvrement par des multicouches afin de développer des particules à libération ultradienne. Un deuxième volet a concerné l'étude de la construction de films de polysaccharides par pulvérisation alternée et simultanée ainsi que de la complexation de ces polysaccharides en solution. Le dernier volet a consisté en la fonctionnalisation de multicouches de CHI/HA par un peptide antimicrobien pour de possibles applications dans le domaine biomédical notamment la fonctionnalisation de cathéter.

Dans le Chapitre III, nous avons étudié la préparation des complexes CHI/HA, futurs cœurs de nanoparticules multicouches permettant la libération ultradienne, en fonction de différents paramètres. Lors de la préparation des complexes, le temps d'agitation n'est pas un paramètre significatif sur la taille des complexes, par contre la concentration en NaCl a une influence sur la stabilité des complexes. La purification des complexes pour éliminer les chaînes de polysaccharides en excès est une étape importante qui selon la méthode choisie peut induire une augmentation du diamètre des complexes. La purification par colonne Sephadex avec centrifugation limite ce phénomène. La construction de multicouches sur les cœurs complexes CHI/HA n'a pas été possible dans notre cas, malgré la réticulation du cœur des nanoparticules. Il serait donc intéressant, au vue des derniers résultats publiés en 2010, de reprendre et poursuivre l'étude en s'appuyant sur les conditions de réalisation décrites

par Díez-Pascual *et al* et en étudiant l'influence d'autres paramètres sur la complexation, tel que le pH des solutions (Diez-Pascual and Wong 2010).

Dans le Chapitre III, nous nous sommes intéressés à la construction de films de polysaccharides par pulvérisation automatisée alternée et simultanée. Dans le cas de la pulvérisation simultanée, la construction des films est linéaire avec le temps cumulé de pulvérisation et la vitesse de croissance des films dépend du rapport molaire de charge polyanion/CHI et est maximale pour un rapport proche de 1. Les films sont construits par accumulation de complexes à la surface du substrat : une corrélation existe entre la vitesse de croissance des films et la taille des complexes en fonction du rapport molaire de charge. Les morphologies des films obtenus sont soit granulaires pour CHI/ALG et CHI/CS, soit sous forme d'îlots pour CHI/HA. La rugosité des films est plus importante lors d'une construction par pulvérisation simultanée que par pulvérisation alternée. Enfin, les films composés de CHI/HA présentent une meilleure biocompatibilité envers les fibroblastes gingivaux humains et ce, quelque soit le procédé de pulvérisation. Il pourrait être intéressant d'étudier l'influence de la force ionique sur l'optimum de rapport de charges obtenu dans le cas de la vitesse de croissance des films ainsi que sur la taille des complexes. En effet, comme la concentration en NaCl contrôle la compensation extrinsèque des charges, les proportions relatives des composés dans le film devraient être modifiées. Il faudrait également étudier l'influence de la concentration en sel à différents pH de construction sur la vitesse de croissance des films. La morphologie de ces films serait également à analyser.

La dernière partie de l'étude (Chapitre V) a été consacrée à la fonctionnalisation de multicouches de CHI/HA construites par trempage avec un peptide antibactérien et antifongique, la cateslytine bovine. Ce peptide a été greffé à l'acide hyaluronique en deux



étapes en utilisant la chimie carbodiimide et une réaction de couplage thiol-maléimide. Nous avons montré que l'activité de la cateslytine était conservée lorsqu'elle était greffée au HA malgré une légère diminution de cette activité. Deux bactéries (*S. aureus* et *M. luteus*) et une levure (*C. albicans*) ont été choisies afin de tester l'activité des films. Un nombre de couches CHI/HA-CTL optimal est nécessaire pour obtenir une activité de 100% d'inhibition de croissance : ce nombre est de 5 bicouches pour *M. luteus*, 15 bicouches pour *C. albicans* et 30 bicouches pour *S. aureus*. Le peptide libre ainsi que HA-CTL en solution ou enfoui dans un film sont internalisés par *C. albicans*. Le film est dégradé et n'est actif que pendant un certain laps de temps (2 jours pour *S. aureus* et au moins 4 jours pour *C. albicans*). Les films CHI/HA-CTL limitent l'adhésion des fibroblastes gingivaux humains sans être cytotoxiques. Ces revêtements semblent être prometteurs pour la fonctionnalisation de cathéters afin de diminuer le développement de maladies nosocomiales. Des tests *in vivo* pourraient être envisagés. Pour permettre une activité plus longue des films, la réticulation de ceux-ci pourrait être envisagée. Il faudrait dans ce cas vérifier si l'activité de tels films est conservée. Afin de pouvoir utiliser ce type de film antibactérien et antifongique pour des implants osseux, l'adhésion des cellules sur ces surfaces pourraient être favorisée par l'utilisation de séquence peptidique RGD.

---

## Références

- Advincula, R., Aust, E., Meyer, W. et Knoll, W. (1996). "In Situ Investigations of Polymer Self-Assembly Solution Adsorption by Surface Plasmon Spectroscopy." *Langmuir* **12**: 3536–3540.
- Andreeva, D. V., Fix, D., Möhwald, H. et Shchukin, D. G. (2008). "Self-Healing Anticorrosion Coatings Based on pH-Sensitive Polyelectrolyte/Inhibitor Sandwichlike Nanostructures." *Advanced Materials* **20**: 2789–2794.
- Antipov, A. A., Sukhorukov, G. B. et Möhwald, H. (2003). "Influence of the Ionic Strength on the Polyelectrolyte Multilayers' Permeability." *Langmuir* **19**: 2444-2448.
- Ariel, G. et Andelman, D. (2003). "Polyelectrolyte persistence length : Attractive effect of counterion correlations and fluctuations." *Europhysics Letters*, 61, 67-73 **61**: 67-73.
- Aslam, R., Atindehou, M., Lavaux, T., Haikel, Y., Schneider, F. et Metz-Boutigue, M.-H. (2012). "Chromogranin A-derived peptides are involved in innate immunity." *Current medicinal Chemistry: ASAP*.
- Bakos, P. et Rasile, J. (1977). Endicott. **Patent US N° 4009033**.
- Ball, V., Hübsch, E., Schweiss, R., Voegel, J.-C., Schaaf, P. et Knoll, W. (2005). "Interactions between Multivalent Ions and Exponentially Growing Multilayers: Dissolution and Exchange Processes." *Langmuir* **21**: 8526-8531.
- Banerjee, I., Pangule, R. C. et Kane, R. S. (2011). "Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms." *Advanced Materials* **23**: 690-718.
- Barker, S. L. R., Ross, D., Tarlov, M. J., Gaitan, M. et Locascio, L. E. (2000). "Control of Flow Direction in Microfluidic Devices with Polyelectrolyte Multilayers." *Analytical Chemistry* **72**: 5925-5929.
- Berg, M. C., Zhai, L., Cohen, R. E. et Rubner, M. F. (2006). "Controlled drug release from porous polyelectrolyte multilayers." *Biomacromolecules* **7**: 357-364.
- Berger, M. (1993). Oral insulin 1922-1992 : history of continuous ambition and failure in Frontiers in Insulin Pharmacology. Stuttgart.
- Bernoux, F., Piel, J.-P., Castellon, B., Defranoux, C., Lecat, J.-H., Boher, P. et Stehlé, J.-L. "Ellipsométrie, Théorie." *Techniques de l'ingénieur* **R 6 490**.
- Binnig, G. et Quate, C. F. (1986). "Atomic Force Microscopy." *Physical review letters* **56**: 930-933.
- Bloch, F. (1946). "Nuclear Induction." *Physical Review* **70**: 460-474.
- Blodgett, K. B. (1934). "Monomolecular films of fatty acids on glass." *Journal of American Chemical Society* **56**: 495.
- Blodgett, K. B. et Langmuir, I. (1937). "Buildup films of barium stearate and their optical properties." *Physical Review* **51**: 964-982.
- Botequim, D., Maia, J., Lino, M. M. F., Lopes, L. M. F., Simoes, P. N., Ilharco, L. M. et Ferreira, L. (2012). "Nanoparticles and Surfaces Presenting Antifungal, Antibacterial and Antiviral Properties." *Langmuir* **28**: 7646-7656.
- Boulmedais, F., Ball, V., Schwinté, P., Frisch, B., Schaaf, P. et Voegel, J.-C. (2003). "Buildup of exponentially growing multilayer polypeptide films with internal secondary structure." *Langmuir* **19**: 440-445.
- Boulmedais, F., Frisch, B., Etienne, O., Lavalle, P., Picart, C., Ogier, J., Voegel, J.-C., Schaaf, P. et Egles, C. (2004). "Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of antimicrobial protection for biomaterials." *Biomaterials* **25**: 2003-2011.

- Boulmedais, F., Schwinté, P., Gergely, C., Voegel, J.-C. et Schaaf, P. (2002). "Secondary structure of polypeptide multilayer films : An example of locally ordered polyelectrolyte multilayers." *Langmuir* **18**: 4523-4525.
- Boulmedais, F., Tang, C. S., Keller, B. et Vörös, J. (2006). "Controlled electrodisolution of polyelectrolyte multilayers: A platform technology towards the surface-initiated delivery of drugs." *Advanced Functional Materials* **16**: 63-70.
- Bratskaya, S., Marinin, D., Simon, F., Synytska, A., Zschoche, S., Busscher, H. J., Jager, D. et van der Mei, H. C. (2007). "Adhesion and viability of two enterococcal strains on covalently grafted chitosan and chitosan/kappa-carrageenan multilayers." *Biomacromolecules* **8**: 2960-2968.
- Briolat, J., Wu, S. D., Mahata, S. K., Gonthier, B., Bagnard, D., Chasserot-Golaz, S., Helle, K. B., Aunis, D. et Metz-Boutigue, M. H. (2005). "New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A." *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**: 377-385.
- Bruellhoff, K., Fiedler, J., Moller, M., Groll, J. et Brenner, R. E. (2010). "Surface coating strategies to prevent biofilm formation on implant surfaces." *International Journal of Artificial Organs* **33**: 646-653.
- Bruening, M. et Dotzauer, D. (2009). "Just spray it." *Nature materials* **8**: 449-450.
- Bucur, C. B., Sui, Z. et Schlenoff, J. B. (2006). "Ideal Mixing in Polyelectrolyte Complexes and Multilayers: Entropy Driven Assembly." *Journal of American Chemical Society* **128**: 13690-13691.
- Büscher, K., Graf, K., Ahrens, H. et Helm, C. A. (2002). "Influence of Adsorption Conditions on the Structure of Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* **18**: 3585-3591.
- Burke, N. A. D., Mazumder, M. A. J., Hanna, M. et Stöver, H. D. H. (2007). "Polyelectrolyte Complexation Between Poly(methacrylic acid, sodium salt) and Poly(diallyldimethylammonium chloride) or Poly[2-(methacryloyloxyethyl)trimethylammonium chloride]." *Journal of Polymer Science PArt A : Polymer Chemistry* **45**: 4129-4143.
- Cao, G., Hong, H. G. et Mallouk, T. E. (1992). "Layered metal phosphates and phosphonates: from crystals to monolayers." *Accounts of Chemical Research* **25**: 420-427.
- Cao, X., Pettitt, M. E., Wode, F., Pilar Arpa Sancet, M., Fu, J., Ji, J., Callow, M. E., Callow, J. A., Rosenhahn, A. et Grunze, M. (2010). "Interaction of Zoospores of the Green Alga *Ulva* with Bioinspired Micro- and Nanostructured Surfaces Prepared by Polyelectrolyte Layer-by-Layer Self-Assembly." *Advanced functional Materials* **20**: 1984-1993.
- Carlson, E. (1983). "Effect of Strain of *Staphylococcus-Aureus* on Synergism with *Candida-Albicans* Resulting in Mouse Mortality and Morbidity." *Infection and Immunity* **42**: 285-292.
- Caruso, F. (2001). "Nanoengineering of Particle Surfaces." *Advanced Materials* **13**: 740.
- Caruso, F., Furlong, D. N., Ariga, K., Ichinose, I. et Kunitake, T. (1998). "Characterization of Polyelectrolyte-Protein Multilayer Films by Atomic Force Microscopy, Scanning Electron Microscopy, and Fourier Transform Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy." *Langmuir* **14**: 4559-4565.
- Castelnovo, M. et Joanny, J.-F. (2000). "Formation of Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* **16**: 7524-7532.
- Chen, M.-C., Liang, H.-F., Chiu, Y.-L., Chang, Y., Wei, H.-J. et Sung, H.-W. (2005). "A novel drug-eluting stent spray-coated with multi-layers of collagen and sirolimus." *Journal of controlled release* **108**: 178-189.

- Chluba, J., Voegel, J.-C., Decher, G., Erbacher, P., Schaaf, P. et Ogier, J. I. (2001). "Peptide Hormone Covalently Bound to Polyelectrolytes and Embedded into Multilayer Architectures Conserving Full Biological Activity." *Biomacromolecules* **2**: 800-805.
- Choi, K. Y., Min, K. H., Na, J. H., Choi, K., Kim, K., Park, J. H., Kwon, I. C. et Jeong, S. Y. (2009). "Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: synthesis, characterization, and in vivo biodistribution." *Journal of Materials Chemistry* **19**: 4102-4107.
- Chua, P. H., Neoh, K. G., Shi, Z. et Kang, E. T. (2008). "Structural stability and bioapplicability assessment of hyaluronic acid-chitosan polyelectrolyte multilayers on titanium substrates." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **87A**: 1061-1074.
- Chuang, H. F., Smith, R. C. et Hammond, P. T. (2008). "Polyelectrolyte multilayers for tunable release of antibiotics." *Biomacromolecules* **9**: 1660-1668.
- Cochin, D. et Laschewsky, A. (1999). "Layer-by-layer." *Macromolecular Chemistry and Physics* **200**: 609-615.
- Crouzier, T., Szarpak, A., Boudou, T., Auzely-Velty, R. et Picart, C. (2010). "Polysaccharide-Blend Multi layers Containing Hyaluronan and Heparin as a Delivery System for rhBMP-2." *Small* **6**: 651-662.
- Dai, J. H. et Bruening, M. L. (2002). "Catalytic nanoparticles formed by reduction of metal ions in multilayered polyelectrolyte films." *Nano Letters* **2**: 497-501.
- Damgé, C. (1991). *Oral insulin in Biotechnology of Insulin Therapy*. Oxford.
- Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kotz, J., Philipp, B., Seidel, C. et Stscherbina, D. (1994). *Polyelectrolytes : formation; characterization and application*. Munich, Hanser and Gardner.
- De Gennes, P. G., Pincus, P., Velasco, R. M. et Brochard, F. (1976). "Remarks on polyelectrolyte conformation." *Le Journal de Physique* **37**: 1461.
- Decher, G. (1997). "Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites." *Science* **277**: 1232-1237.
- Decher, G. et Hong, J. D. (1991). "Build-up of ultrathin multilayer films by self-assembly process : II Consecutive adsorption of ionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces." *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **95**: 1430-1434.
- Decher, G. et Schmitt, J. (1992). "Fine-tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of ionic polyelectrolytes." *Progr. Colloid. Polym. Sci.* **89**: 160-164.
- DeLongchamp, D. M. et Hammond, P. T. (2004). "High-contrast electrochromism and controllable dissolution of assembled Prussian blue/polymer nanocomposites." *Advanced Functional Materials* **14**: 224-232.
- Diez-Pascual, A. M. et Wong, J. E. (2010). "Effect of layer-by-layer confinement of polypeptides and polysaccharides onto thermoresponsive microgels: A comparative study." *Journal of Colloid and Interface Science* **347**: 79-89.
- Dippy, J. F. J., Hughes, S. R. C. et Rozanski, A. (1959). "The dissociation constants of some symmetrically disubstituted succinic acids " *Journal of the Chemical Society* **498**: 2492-2498.
- Dobrynin, A. V., Colby, R. H. et Rubinstein, M. (1995). "Scaling Theory of Polyelectrolyte Solutions." *Macromolecules* **28**: 1859-1871.
- Douglas, K. L. et Tabrizian, M. (2005). "Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier." *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **16**: 43-56.
- Dubas, S. T. et Schlenoff, J. B. (1999). "Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers." *Macromolecules* **32**: 8153-8160.

- Dubas, S. T. et Schlenoff, J. B. (2001). "Polyelectrolyte Multilayers Containing a Weak Polyacid: Construction and Deconstruction." *Macromolecules* **34**: 3736-3740.
- Duceppe, N. et Tabrizian, M. (2009). "Factors influencing the transfection efficiency of ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles." *Biomaterials* **30**: 2625-2631.
- El Haitami, A. E., Martel, D., Ball, V., Nguyen, H. C., Gonthier, E., Labbe, P., Voegel, J.-C., Schaaf, P., Senger, B. et Boulmedais, F. (2009). "Effect of the Supporting Electrolyte Anion on the Thickness of PSS/PAH Multilayer Films and on Their Permeability to an Electroactive Probe." *Langmuir* **25**: 2282-2289.
- Elbert, D. L., Herbert, C. B. et Hubbell, J. A. (1999). "Thin Polymer Layers Formed by Polyelectrolyte Multilayer Techniques on Biological Surfaces." *Langmuir*: 5355-5362.
- Erbacher, P., Zou, S. M., Bettinger, T., Steffan, A. M. et Remy, J. S. (1998). "Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: Biophysical characteristics and transfection ability." *Pharmaceutical Research* **15**: 1332-1339.
- Etienne, O., Gasnier, C., Taddei, C., Voegel, J. C., Aunis, D., Schaaf, P., Metz-Boutigue, M. H., Bolcato-Bellemin, A. L. et Egles, C. (2005). "Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films." *Biomaterials* **26**: 6704-12.
- Etienne, O., Picart, C., Taddei, C., Haikel, Y., Dimarcq, J. L., Schaaf, P., Voegel, J. C., Ogier, J. A. et Egles, C. (2004). "Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization." *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3662-9.
- Farhat, T. R. et Schlenoff, J. B. (2001). "Ion Transport and Equilibria in Polyelectrolyte Multilayers " *Langmuir* **17**: 1184-1192.
- Felix, O., Zheng, Z., Cousin, F. et Decher, G. (2009). *Compte Rendu de Chimie* **12**: 225-234.
- Fioretti, F., Mendoza-Palomares, C., Helms, M., Al Alam, D., Richert, L., Arntz, Y., Rinckenbach, S., Garnier, F., Haikel, Y., Gangloff, S. C. et Benkirane-Jessel, N. (2010). "Nanostructured Assemblies for Dental Application." *ACS Nano* **4**: 3277-3287.
- Freed, L. E., Marquis, J. C., Nohria, A., Emmanuel, J., Mikos, A. G. et Langer, R. (1993). "Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers." *Journal of Biomedical Materials Research* **27**: 11-23.
- Frere, Y., Danicher, L. et Belcourt, A. (2004). Vector for oral administration of pharmaceuticals, useful particularly for delivering insulin or vaccines, comprises hydrophilic matrix in which the outer surface is modified to impart lipophilicity. CNRS. **Patent FR2854072-A1; WO2004096172-A2; EP1633392-A2.**
- Fromherz, P. (1980). Assembling of Proteins at Lipid Monolayers, in: Electron Microscopy at Molecular Dimensions. Berlin, Eds. W. Baumeister and W. Vogell.
- Fu, J. H., Ji, J., Fan, D. Z. et Shen, J. C. (2006). "Construction of antibacterial multilayer films containing nanosilver via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan-silver ions complex." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **79A**: 665-674.
- Fu, J. H., Ji, J., Yuan, W. Y. et Shen, J. C. (2005). "Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan." *Biomaterials* **26**: 6684-6692.
- Fukao, N., Kyung, K.-H., Fujimoto, K. et Shiratori, S. (2011). "Automatic Spray-LBL Machine Based on in-Situ QCM Monitoring." *Macromolecules* [doi.org/10.1021/ma200024w](https://doi.org/10.1021/ma200024w).
- Gao, J. Y., Dubin, P. L. et Muhoberac, B. B. (1998). "Capillary Electrophoresis and Dynamic Light Scattering Studies of Structure and Binding Characteristics of Protein-Polyelectrolyte Complexes." *The Journal of Physical Chemistry B* **102**: 5529-5535.

- Garza, J. M., Schaaf, P., Muller, S., Ball, V., Stoltz, J.-F., Voegel, J.-C. et Lavalle, P. (2004). "Multicompartment Films Made of Alternate Polyelectrolyte Multilayers of Exponential and Linear Growth." *Langmuir*: 7298-7302.
- Glinel, K., Moussa, A., Jonas, A. M. et Laschewsky, A. (2002). "Influence of Polyelectrolyte Charge Density on the Formation of Multilayers of Strong Polyelectrolytes at Low Ionic Strength." *Langmuir* **18**: 1408-1412.
- Glinel, K., Thebault, P., Humblot, V., Pradier, C. M. et Jouenne, T. (2012). "Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches." *Acta Biomaterialia* **8**: 1670-1684.
- Gölander, C. G., Arwin, H., Eriksson, J. C., Lundstrom, I. et Larsson, R. (1982). "Heparin surface film formation through adsorption of colloidal particles studied by ellipsometry and scanning electron microscopy." *Colloids and Surfaces* **5**: 1-16.
- Grandcolas, M., Louvet, A., Keller, N. et Keller, V. (2009). "Layer-by-Layer Deposited Titanate-Based Nanotubes for Solar Photocatalytic Removal of Chemical Warfare Agents from Textiles." *Angewandte Chemie International Edition*. **48**: 161 –164.
- Gribova, V., Auzely-Velty, R. et Picart, C. (2012). "Polyelectrolyte Multilayer Assemblies on Materials Surfaces: From Cell Adhesion to Tissue Engineering." *Chemistry of Materials* **24**: 854-869.
- Grigoriev, D. O., Köhler, K., Skorb, E., Shchukin, D. G. et Möhwald, H. (2009). "Polyelectrolyte complexes as a ‘‘smart’’ depot for self-healing anticorrosion coatings." *Soft Matter* **5**: 1426–1432.
- Guggenbichler, J. P., Assadian, O., Boeswald, M. et Kramer, A. (2011). "Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials - catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections." *GMS Krankenhauhygiene Interdisziplinär* **6**: 1.
- Guillaume-Gentil, O., Graf, N., Boulmedais, F., Schaaf, P., Voros, J. et Zambelli, T. (2010). "Global and local view on the electrochemically induced degradation of polyelectrolyte multilayers: from dissolution to delamination." *Soft Matter* **6**: 4246-4254.
- Guyomard, A., De, E., Jouenne, T., Malandain, J.-J., Muller, G. et Glinel, K. (2008). "Incorporation of a hydrophobic antibacterial peptide into amphiphilic polyelectrolyte multilayers: A bioinspired approach to prepare biocidal thin coatings." *Advanced Functional Materials* **18**: 758-765.
- Guyomard, A., Nysten, B., Muller, G. et Glinel, K. (2006). "Loading and Release of Small Hydrophobic Molecules in Multilayer Films Based on Amphiphilic Polysaccharides." *Langmuir* **22**: 2281-2287.
- Hammond-Cunningham, P., T., Krogman, C., K. et Zacharia, N., S. (2007). Automated Spray-LbL Technology. **Patent PCT Serial N° US07/019247**.
- Harriott, M. M. et Noverr, M. C. (2009). "Candida albicans and Staphylococcus aureus Form Polymicrobial Biofilms: Effects on Antimicrobial Resistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 3914-3922.
- Harris (2000). "Layered Polyelectrolyte Films as Selective, Ultrathin Barriers for Anion Transport." *Chemistry of Materials* **12**: 1941-1946.
- Haug, A. et Smidsrod, O. (1965). "The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions." *Acta Chemica Scandinavica* **19**: 341-351.
- He, M., Zhao, Z., Yin, L., Tang, C. et Yin, C. (2009). "Hyaluronic acid coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles as anticancer drug carriers." *International Journal of Pharmaceutics* **373**: 165-173.
- Hillberg, A. L., Holmes, C. A. et Tabrizian, M. (2009). "Effect of genipin cross-linking on the cellular adhesion properties of layer-by-layer assembled polyelectrolyte films." *Biomaterials* **30**: 4463-4470.

- Hofmeister, F. (1888). *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **24**: 247-260.
- Hofmeister, F. (1890). *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **27**: 395-413.
- Hoogeveen, N. G., Cohen Stuart, M. A. et Fleer, G. J. (1996). "Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes." *Langmuir* **12**: 3675-3681.
- Hook, F., Rodahl, M., Brzezinski, P. et Kasemo, B. (1998). "Measurements using the quartz crystal microbalance technique of ferritin monolayers on methylthiolated gold : Dependence of energy dissipation and saturation coverage on salt concentration." *Journal of Colloid and Interface Science.* **208**: 63-67.
- Hu, F. X., Neoh, K. G., Cen, L. et Kang, E. T. (2005). "Antibacterial and antifungal efficacy of surface functionalized polymeric beads in repeated applications." *Biotechnology and Bioengineering* **89**: 474-484.
- Hubbe, M. A., M., M. S. et Lee, S. Y. (2005). "Effects of Charge Ratios and Cationic Polymer Nature on Polyelectrolyte Complex Deposition onto Cellulose." *Industrial Engineering Chemistry Research* **44**: 3068-3074.
- Hübsch, E., Ball, V., Senger, B., Decher, G., Voegel, J.-C. et Schaaf, P. (2004). "Controlling the Growth Regime of Polyelectrolyte Multilayer Films: Changing from Exponential to Linear Growth by Adjusting the Composition of Polyelectrolyte Mixtures." *Langmuir* **20**: 1980-1985.
- Hübsch, E., Fleith, G., Fatisson, J., Labbe, P., Voegel, J.-C., Schaaf, P. et Ball, V. (2005). "Multivalent Ion/Polyelectrolyte Exchange Processes in Exponentially Growing Multilayers." *Langmuir* **21**: 3664-3669.
- Iler, R. K. (1966). "Multilayers of colloidal particles." *Journal of Colloid and Interface Science.* **21**: 569-594.
- Institut de veille sanitaire , F. (2006). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales.
- Ishaug, S. L., Crane, G. M., Miller, M. J., Yasko, A. W., Yaszemski, M. J. et Mikos, A. G. (1997). "Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds." *Journal of Biomedical Materials Research* **36**: 17-28.
- Izquierdo, A., Ono, S. S., Voegel, J.-C., Schaaf, P. et Decher, G. (2005). "Dipping versus Spraying: Exploring the Deposition. Conditions for Speeding Up Layer-by-Layer Assembly." *Langmuir* **21**: 7558-7567.
- Jain (2006). " analyse Bionest." *MedMarketDiligence LLC avril 2005*.
- Jain, A. et Jain, S. K. (2008). "In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **35**: 404-416.
- Jessel, N., Atalar, F., Lavalle, P., Mutterer, J., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C. et Ogier, J. (2003). "Bioactive coatings based on a polyelectrolyte multilayer architecture functionalized by embedded proteins." *Advanced Materials* **15**: 692-695.
- Jessel, N., Schwinté, P., Falvey, P., Darcy, R., Haïkel, Y., Schaaf, P., Voegel, J.-C. et Ogier, J. (2004). "Build-up of polypeptide multilayer coatings with Anti-Inflammatory properties based on the embedding of Piroxicam-Cyclodextrin Complexes." *Advanced functional Materials* **14**: 174-182.
- Ji, M. H., Wang, Y. J., Xu, Z. H. et Guo, Y. C. (1984). "Studies on the M-G ratios in alginate." *Hydrobiologia* **116**: 554-556.
- Jiang, C., Markutsya, S. et Tsukruk, V. (2004). "Compliant, robust, and truly anisotropic free-standing multilayer films fabricated using spin-assisted layer-by-layer assembly." *Advanced Materials* **16**: 157-161.

- Jürgens, C., Schulz, A. P., Porté, T., Faschingbauer, M. et Seide, K. (2006). "Biodegradable Films in Trauma and Orthopedic Surgery. ." *European Journal of Trauma* **32**: 160 - 171.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V. et Alakhov, V. Y. (2002). "Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery." *Journal of Controlled Release* **82**: 189-212.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V. et Alakhov, V. Y. (2002b). "Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer." *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**: 759-779.
- Kabanov, V. A., Ed. (1994a). *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. New York, Springer-Verlag.
- Kabanov, V. A. (1994b). "Physicochemical basis and the prospects of using soluble interpolyelectrolyte complex (review)." *Polymer Science* **36**: 143-156.
- Kalberlah, K. et Mollah, Z. (2005). **German Patent No. DE 10 2004 020 879**.
- Karel, M. et Langer, R. (1988). Controlled Release of Food Additives. *Flavor Encapsulation*. ACS, ACS Symposium Series. **370**: 177-191.
- Katneni, R. et Hedayati, S. S. (2007). "Central venous catheter-related bacteremia in chronic hemodialysis patients: epidemiology and evidence-based management." *Nature Clinical Practice Nephrology* **3**: 256-266.
- Kerdjoudj, H., Boura, C., Moby, V., Montagne, K., Schaaf, P., Voegel, J. C., Stoltz, J. F. et Menu, P. (2007). "Re-endothelialization of Human Umbilical Arteries Treated with Polyelectrolyte Multilayers: A Tool for Damaged Vessel Replacement." *Advanced Functional Materials* **17**: 2667-2673.
- Kharlampieva, E., Kozlovskaya, V., Tyutina, J. et Sukhishvili, S. A. (2005). "Hydrogen-Bonded Multilayers of Thermoresponsive Polymers." *Macromolecules* **38**: 10523-10531.
- Kharlampieva, E. et Sukhishvili, S. A. (2003). "Ionization and pH Stability of Multilayers Formed by Self-Assembly of Weak Polyelectrolytes." *Langmuir* **19**: 1235-1243.
- Klotz, S. A., Chasin, B. S., Powell, B., Gaur, N. K. et Lipke, P. N. (2007). "Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **59**: 401-406.
- Kolasinska, M., Krastev, R., Gutberlet, T. et Warszynski, P. (2009). "Layer-by-Layer Deposition of Polyelectrolytes. Dipping versus Spraying." *Langmuir* **25**: 1224-1232.
- Kotov, N. A. (1999). "Layer-by-layer self-assembly: the contribution of hydrophobic interactions." *Nanostructured Materials* **1**: 789-796.
- Kovacevic, D., Van Der Burgh, S., De Keizer, A. et Cohen Stuart, M. A. (2002). "Kinetics of Formation and Dissolution of Weak Polyelectrolyte Multilayers: Role of Salt and Free Polyions." *Langmuir* **18**: 5607-5612.
- Krasemann, L. et Tieke, B. (2000). "Selective Ion Transport across Self-Assembled Alternating Multilayers of Cationic and Anionic Polyelectrolytes." *Langmuir* **16**: 287-290.
- Krogman, K., C., Lyon, K., F. et Hammond, P., T. (2008a). "Metal Ion Reactive Thin Films Using Spray Electrostatic LbL Assembly." *Journal of Physical Chemistry B* **112**: 14453-14460.
- Krogman, K., Zacharia, N. S., Grillo, D. M. et Hammond, P. T. (2008b). "Photocatalytic Layer-by-Layer Coatings for Degradation of Acutely Toxic Agents." *Chemistry of Materials* **20**: 1924-1930.
- Krogman, K. C., Lowery, J. L., Zacharia, N. S., Rutledge, G. C. et Hammond, P. T. (2009). "Spraying asymmetry into functional membranes layer-by-layer." *Nature Materials* **8**: 512-518.



- Ladam, G., Schaad, P., Voegel, J.-C., Schaaf, P., Decher, G. et Cuisinier, F. (2000). "In Situ Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* **16**: 1249–1255.
- Lamaka, S. V., Shchukin, D. G., Andreeva, D. V., Zheludkevich, M. L., Möhwald, H. et Ferreira, M. G. S. (2009). "Sol-Gel/Polyelectrolyte Active Corrosion Protection System." *Advanced functional Materials* **18**: 3137–3147.
- Langer, R. et Vacanti, J. P. (1993). "Tissue Engineering." *Science* **260**: 920-926.
- Lapcik, L., De Smedt, S., Demeester, J. et Chabreck, P. (1998). "Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications." *Chemical Reviews* **98**: 2663-2684.
- Laugel, N., Betscha, C., Winterhalter, M., Voegel, J.-C., Schaaf, P. et Ball, V. (2006). "Relationship between the Growth Regime of Polyelectrolyte Multilayers and the Polyanion/Polycation Complexation Enthalpy." *Journal of Physical Chemistry B* **110**: 19443-19449.
- Laugel, N., Hemmerlé, J., Ladhari, N., Arntz, Y., Gonthier, E., Haikel, Y., Voegel, J.-C., Schaaf, P. et Ball, V. (2008). "Composite films of polycations and TiO<sub>2</sub> nanoparticles with photoinduced superhydrophilicity." *Journal of Colloid and Interface Science*. **324**: 127–133.
- Laugel, N., Hemmerlé, N., Porcel, C., Voegel, J.-C., Schaaf, P. et Ball, V. (2007). "Nanocomposite Silica/Polyamine Films Prepared by a Reactive Layer-by-Layer Deposition." *Langmuir* **23**: 3706-3711.
- Lavalle, P., Gergely, C., Cuisinier, F. J. G., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J.-C. et Picart, C. (2002). "Comparison of the structure of polyelectrolytes multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime : An in situ atomic force microscopy study." *Macromolecules* **35**: 4458-4465.
- Lavalle, P., Picart, C., Mutterer, J., Gergely, C., Reiss, H., Voegel, J.-C., Senger, B. et Schaaf, P. (2004). "Modeling the build-up of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth." *Journal of Physical Chemistry B* **108**: 636-648.
- Lee, D., Cohen, R. E. et Rubner, M. F. (2005). "Antibacterial properties of Ag nanoparticle loaded multilayers and formation of magnetically directed antibacterial microparticles." *Langmuir* **21**: 9651-9659.
- Lee, D., Rubner, M. F. et Cohen, R. E. (2005b). "Formation of nanoparticle-loaded microcapsules based on hydrogen-bonded multilayers." *Chemistry of Materials* **17**: 1099-1105.
- Lee, S.-S., Hong, J.-D., Kim, C. H., Kim, K., Koo, J. P. et Lee, K.-B. (2001). "Layer-by-Layer Deposited Multilayer Assemblies of Ionene-Type Polyelectrolytes Based on the Spin-Coating Method." *Macromolecules* **3**: 5358-5360.
- Lefort, M. (2011b). Dépôt de films minces par pulvérisation simultanée de composés organiques en interaction électrostatique. Strasbourg, Université de Strasbourg.
- Lefort, M., Boulmedais, F., Jierry, L., Gonthier, E., Voegel, J.-C., Hemmerlé, J., Lavalle, P., Ponche, A. et Schaaf, P. (2011). "Simultaneous Spray Coating of Interacting Species: General Rules Governing the Poly(styrene sulfonate)/Poly(allylamine) System." *Langmuir* **27**: 4653–4660.
- Lefort, M., Popa, G., Seyrek, E., Szamocki, R., Felix, O., Hemmerlé, J., Vidal, L., Voegel, J.-C., Boulmedais, F., Decher, G. et Schaaf, P. (2010). "Spray-On Organic/Inorganic Films: A General Method for the Formation of Functional Nano- to Microscale Coatings." *Angewandte Chemie International Edition*. **49**: 10110–10113.
- Levy, D. J. (1970). Lockheed. **US Patent No. US 3 515 571**.
- Lewis, J. A., Matsuyama, H., Kirby, G., Morissette, S. et Young, J. F. (2000). "Polyelectrolyte Effects on the Rheological Properties of Concentrated Cement Suspensions." *Journal of the American Ceramic Society* **83**: 1905-1913.

- Li, Z., Lee, D., Sheng, X. X., Cohen, R. E. et Rubner, M. F. (2006). "Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities." *Langmuir* **22**: 9820-9823.
- Lichtman, J. W. et Conchello, J. A. (2005). "Fluorescence Microscopy." *Nature Methods* **2**: 910-919.
- Liu, Y., Zhao, Bergbreiter, D. E. et Crooks, R. M. (1997). "pH-Switchable, Ultrathin Permselective Membranes Prepared from Multilayer Polymer Composites." *Journal of American Chemical Society* **119**: 8720-8721.
- Liu, Z.-M., Gu, Q., Xu, Z.-K. et Groth, T. (2010). "Synergistic Effect of Polyelectrolyte Multilayers and Osteogenic Growth Medium on Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells." *Macromolecular Bioscience* **10**: 1043-1054.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M. et Kelly, S. (2002). "Molecular basis of resistance to azole antifungals." *Trends in Molecular Medicine* **8**: 76-81.
- Lvov, Y., Ariga, K., Ondaa, M., Ichinoseb, I. et Kunitake, T. (1999). "A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation " *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **146**: 337-346
- Malcher, M., Volodkin, D., Heurtault, B., Andre, P., Schaaf, P., Moehwald, H., Voegel, J.-C., Sokolowski, A., Ball, V., Boulmedais, F. et Frisch, B. (2008). "Embedded silver ions-containing liposomes in polyelectrolyte multilayers: Cargos films for antibacterial agents." *Langmuir* **24**: 10209-10215.
- Manning, G. S. (1978). "The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides." *Quarterly Reviews of Biophysics* **11**: 179-246
- Mendelsohn, J. D., Barrett, C. J., Chan, V. V., Pal, A. J., Mayes, A. M. et Rubner, M. F. (2000). "Fabrication of Microporous Thin Films from Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* **16**: 5017-5023.
- Mendelsohn, J. D., Yang, S. Y., Hiller, J., Hochbaum, A. I. et Rubner, M. F. (2003). "Rational Design of Cytophilic and Cytophobic Polyelectrolyte Multilayer Thin Films." *Biomacromolecules* **4**: 96-106.
- Merrill, M. H. et Sun, C. T. (2009). "Fast, simple and efficient assembly of nanolayered materials and devices." *Nanotechnology* **20**.
- Mertz, M., Hemmerlé, J., Mutterer, J., Ollivier, S., Voegel, J.-C., Schaaf, P. et Lavalle, P. (2007). "Mechanically Responding Nanovalves Based on Polyelectrolyte Multilayers." *Nano Letters* **7**: 657-662.
- Mhanna, R., Vörös, J. et Zenobi-Wong, M. (2011). "Layer-by-Layer Films Made from Extracellular Matrix Macromolecules on Silicone Substrates." *Biomacromolecules* **12**: 609-616.
- Michaels, A. S. et Miekka, R. G. (1961). "Polycation-polyanion complexes : preparation and properties of pol-(vinyl-benzyl-trimethylammonium)/ poly-(styrene sulfonate)." *Journal of Physical Chemistry* **65**: 1765-2160.
- Michel, M., Arntz, Y., Fleith, G., Toquant, J., Haikel, Y., Voegel, J.-C., Schaaf, P. et Ball, V. (2006). "Layer-by-Layer Self-Assembled Polyelectrolyte Multilayers with Embedded Liposomes: Immobilized Submicronic Reactors for Mineralization." *Langmuir* **22**: 2358-2364.
- Mjahed, H., Porcel, C., Senger, B., Chassepot, A., Netter, P., Gillet, P., Decher, G., Voegel, J.-C., Schaaf, P., Benkirane-Jessel, N. et Boulmedais, F. (2008). "Micro-stratified architectures based on successive stacking of alginate gel layers and poly(L-lysine)-hyaluronic acid multilayer films aimed at tissue engineering." *Soft Matter* **4**: 1422-1429.

- Netzer, L. et Sagiv, J. (1983). "A new approach to construction of artificial monolayer assemblies." *Journal of the American Chemical Society* **105**: 674-676.
- Nguyen, P. M., Zacharia, N. S., Verploegen, E. et Hammond, P. T. (2007). "Extended release antibacterial layer-by-layer films incorporating linear-dendritic block copolymer micelles." *Chemistry of Materials* **19**: 5524-5530.
- O'Brian, D., Vogler, J., Landry, J. M. et Jakubowski, G. S. (2001). **US Patent No. US 6 168 825**.
- Oosterhof, J. J. H., Buijssen, K. J. D. A., Busscher, H. J., van der Laan, B. F. A. M. et van der Mei, H. C. (2006). "Effects of quaternary ammonium silane coatings on mixed fungal and bacterial biofilms on tracheoesophageal shunt prostheses." *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3673-3677.
- Oyarzun-Ampuero, F. A., Brea, J., Loza, M. I., Torres, D. et Alonso, M. J. (2009). "Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma." *International Journal of Pharmaceutics* **381**: 122-129.
- Paasche [http://www.paascheairbrush.com/double\\_action\\_airbrushes.html](http://www.paascheairbrush.com/double_action_airbrushes.html).
- Page, B., Page, M. et Noel, C. (1993). "A New Fluorometric Assay for Cytotoxicity Measurements in-Vitro." *International Journal of Oncology* **3**: 473-476.
- Papp, R. "Cellules d'électrolyse." *Technique de l'ingénieur* **J 4 800**.
- Pavluhina, S., Lu, Y. M., Patimetha, A., Libera, M. et Sukhishvili, S. (2010). "Polymer Multilayers with pH-Triggered Release of Antibacterial Agents." *Biomacromolecules* **11**: 3448-3456.
- Philipp, B., Dautzenberga, H., Linowa, K.-J., Kötza, J. et Dawydoffa, W. (1989). "Polyelectrolyte complexes — recent developments and open problems " *Progress in Polymer Science* **14**: 91-172.
- Picart, C., Lavalley, P., Hubert, P., Cuisinier, F. J. G., Decher, G., Schaaf, P. et Voegel, J.-C. (2001). "Buildup Mechanism for Poly(L-lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface." *Langmuir* **17**: 7414-7424.
- Picart, C., Mutterer, J., Richert, L., Luo, Y., Prestwich, G. D., Schaaf, P., Voegel, J.-C. et Lavalley, P. (2002). "Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers." *PNAS* **99**.
- Porcel, C., Lavalley, P., Ball, V., Decher, G., Senger, B., Voegel, J.-C. et Schaaf, P. (2006). "From Exponential to Linear Growth in Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* **22**: 4376-4383.
- Porcel, C., Lavalley, P., Decher, G., Senger, B., Voegel, J.-C. et Schaaf, P. (2007). "Influence of the Polyelectrolyte Molecular Weight on Exponentially Growing Multilayer Films in the Linear Regime." *Langmuir* **23**: 1898-1904.
- Porcel, C. H., Izquierdo, A., Ball, V., Decher, G., Voegel, J.-C. et Schaaf, P. (2005). "Ultrathin Coatings and (Poly(glutamic acid)/ Polyallylamine) Films Deposited by Continuous and Simultaneous Spraying." *Langmuir* **21**: 800-802.
- Prucek, R., Tucek, J., Kilianova, M., Panacek, A., Kvitek, L., Filip, J., Kolar, M., Tomankova, K. et Zboril, R. (2011). "The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles." *Biomaterials* **32**: 4704-4713.
- Pruitt, J. D., Winteron, L. C., Kumar, S. R. et Smith, D. A. (2008). Method for applying a coating onto a silicone hydrogel lens Ciba\_Vision\_corporation. USA, Patent. **Patent US 2008/0100796 A1**.
- Purcell, E. M., Torrey, H. C. et Pound, R. V. (1946). "Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid." *Physical Review* **69**: 37-38.

- Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V., Smagghe, G. et Steurbaut, W. (2003). "Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action." *Biomacromolecules* **4**: 1457-1465.
- Ramage, G., Martinez, J. P. et Lopez-Ribot, J. L. (2006). "Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem." *Fems Yeast Research* **6**: 979-986.
- Ramsden, J. J., Lvov, Y. M. et Decher, G. (1995). "Determination of optical constants of molecular films assembled via alternate polyion adsorption." *Thin Solid Films* **254**: 246-251.
- Ratner, B. D. (1996). "The engineering of biomaterials exhibiting recognition and specificity." *Journal of Molecular Recognition* **9**: 617-625.
- Ratner, B. D. et Bryant, S. J. (2004). "Biomaterials : Where we have been and where we are going." *Annual Review of Biomedical Engineering* **6**: 41-75.
- Reisch, A., Hemmerlé, J., Chassepot, A., Lefort, M., Benkirane-Jessel, N., Candolfi, E., Mesini, P., Letscher-Bru, V., Voegel, J.-C. et Schaaf, P. (2010). "Anti-fouling phosphorylcholine bearing polyelectrolyte multilayers: Cell adhesion resistance at rest and under stretching." *Soft Matter* **6**: 1503-1512.
- Reisch, A., Hemmerle, J., Voegel, J.-C., Gonthier, E., Decher, G., Jessel, N., Chassepot, A., Mertz, D., Lavallo, P., Mesini, P. et Schaaf, P. (2008). "Polyelectrolyte multilayer coatings that resist protein adsorption at rest and under stretching." *Journal of Materials Chemistry* **18**: 4242-4245.
- Reyes, D. R., Perruccio, E. M., Becerra, S. P., Locascio, L. E. et Gaitan, M. (2004). "Micropatterning Neuronal Cells on Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* **20**: 8805-8811.
- Richert, L., Boulmedais, F., Lavallo, P., Mutterer, J., Ferreux, E., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J. C. et Picart, C. (2004a). "Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking." *Biomacromolecules* **5**: 284-294.
- Richert, L., Lavallo, P., Payan, E., Shu, X. Z., Prestwich, G. D., Stoltz, J. F., Schaaf, P., Voegel, J. C. et Picart, C. (2004b). "Layer by layer buildup of polysaccharide films: Physical chemistry and cellular adhesion aspects." *Langmuir* **20**: 448-458.
- Rivoal, J.-C. et Frétiigny, C. "Microscopie à force atomique (AFM)." *Techniques de l'ingénieur* **R 1 394**.
- Rodriguez, L. N. J., De Paul, S. M., Barrett, C. J., Reven, L. et Spiess, H. W. (2000). "Fast Magic-Angle Spinning and Double-Quantum 1H Solid-State NMR Spectroscopy of Polyelectrolyte Multilayers." *Advanced Materials* **12**: 1934-1938.
- Saether, H. V., Holme, H. K., Maurstald, G., Smidsrod, O. et Stokke, B. T. (2008). "Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan." *Carbohydrate Polymers* **74**: 813-821.
- Sakurai, A. et Togasaki, J. (2005). O. S. C. L. Advance Company Ltd. **European Patent No. EP 1 557 483**,
- Salomäki, M., Tervasmaki, P., Areva, S. et Kankare, J. (2004). "The Hofmeister Anion Effect and the Growth of Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* **20**: 3679-3683.
- Salomäki, M., Vinokurov, I. A. et Kankare, J. (2005). "Effect of Temperature on the Buildup of Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* **21**: 11232-11240.
- Sauerbrey, G. (1959). " Verwendung von Schwingquartzen zur Waegung duenner Schichten und zur Mikrowaegung." *Z. Phys.* **155**: 206-222.
- Schlenoff, J. B. et Dubas, S. T. (2001). "Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution." *Macromolecules* **34**: 592-598.
- Schlenoff, J. B., Dubas, S. T. et Farhat, T. (2000). "Sprayed Polyelectrolyte Multilayers." *Langmuir* **16**: 9968-9969.

- Schlenoff, J. B., Rmaile, A. H. et Bucur, C. B. (2008). "Hydration Contributions to Association in Polyelectrolyte Multilayers and Complexes: Visualizing Hydrophobicity." *Journal of American Chemical Society* **130**: 13589–13597.
- Schuetz, P. et Caruso, F. (2002). "Multilayer thin films based on polyelectrolyte-complex nanoparticles." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **207**: 33-40.
- Schultz, P., Vautier, D., Richert, L., Jessel, N., Haikel, Y., Schaaf, P., Voegel, J. C., Ogier, J. et Debry, C. (2005). "Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, alpha-MSH, for coating a tracheal prosthesis." *Biomaterials* **26**: 2621-2630.
- Seyrek, E., Dubin, P. L., Tribet, C. et Gamble, E. A. (2003). "Ionic Strength Dependence of Protein-Polyelectrolyte Interactions." *Biomacromolecules* **4**: 273-282.
- Shi, X., Cassagneau, T. et Caruso, F. (2002). "Electrostatic Interactions between Polyelectrolytes and a Titania Precursor: Thin Film and Solution Studies." *Langmuir* **18**: 904-910.
- Shi, Z., Neoh, K. G., Zhong, S. P., Yung, L. Y., Kang, E. T. et Wang, W. (2006). "In vitro antibacterial and cytotoxicity assay of multilayered polyelectrolyte-functionalized stainless steel." *J Biomed Mater Res A* **76**: 826-34.
- Shiratori, S. S. et Rubner, M. F. (2000). "pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes." *Macromolecules* **33**: 4213-4219.
- Shirliff, M. E., Peters, B. M. et Jabra-Rizk, M. A. (2009). "Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria." *Fems Microbiology Letters* **299**: 1-8.
- Shooshtarizadeh, P., Zhang, D., Chich, J. F., Gasnier, C., Schneider, F., Haikel, Y., Aunis, D. et Metz-Boutigue, M. H. (2010). "The antimicrobial peptides derived from chromogranin/secretogranin family, new actors of innate immunity." *Regulatory Peptides* **165**: 102-110.
- Shukla, A., Fleming, K. E., Chuang, H. F., Chau, T. M., Loose, C. R., Stephanopoulos, G. N. et Hammond, P. T. (2010). "Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces." *Biomaterials* **31**: 2348-2357.
- Siegel, R. A. et Firestone, B. A. (1988). "pH-Dependent Equilibrium Swelling Properties of Hydrophobic Polyelectrolyte Copolymer Gels." *Macromolecules* **21**: 3254-3259.
- Silverstein, A. et Donatucci, C. F. (2003). "Bacterial Biofilms and implantable prosthetic devices." *Int J Impot Res* **15**: S150-S154.
- Smith, R. N., Reven, L. et Barrett, C. J. (2003). "<sup>13</sup>C Solid-State NMR Study of Polyelectrolyte Multilayers." *Macromolecules* **36**: 1876-1881.
- Steitz, R., Jaeger, W. et von Klitzing, R. (2001). "Influence of Charge Density and Ionic Strength on the Multilayer Formation of Strong Polyelectrolytes." *Langmuir* **17**: 4471-4474.
- Stockton, W. B. et Rubner, M. F. (1997). "Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions." *Macromolecules* **30**: 2717-2725.
- Strand, S. P., Tommeraas, K., Varum, K. M. et Ostgaard, K. (2001). "Electrophoretic light scattering studies of chitosans with different degrees of N-acetylation." *Biomacromolecules* **2**: 1310-1314.
- Sui, Z., Salloum, D. et Schlenoff, J. B. (2003). "Effect of Molecular Weight on the Construction of Polyelectrolyte Multilayers: Stripping versus Sticking." *Langmuir* **19**: 2491-2495.
- Sukhishvili, S. A., Kharlampieva, E. et Izumrudov, V. (2006). "Where Polyelectrolyte Multilayers and Polyelectrolyte Complexes Meet." *Macromolecules* **39**: 8873–8881.

- Tadmor, R., Hernandez-Zapata, E., Chen, N., Pincus, P. et Israelachvili, J. N. (2002). "Debye Length and Double-Layer Forces in Polyelectrolyte Solutions." *Macromolecules* **35**: 2380-2388.
- Tan, H. L., McMurdo, M. J., Pan, G. et Van Patten, P. G. (2003). "Temperature Dependence of Polyelectrolyte Multilayer Assembly." *Langmuir* **19**: 9311-9314.
- Thierry, B., Winnik, F. M., Merhi, Y., Silver, J. et Tabrizian, M. (2003). "Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers." *Biomacromolecules* **4**: 1564-1571.
- Thunemann, A. F., Muller, M., Dautzenberg, H., Joanny, J. F. O. et Lowen, H. (2004). *Advanced Polymer Science*: 113-171.
- Tsuchida, E. et Abe, K. (1982). Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes. Heidelberg, Springer-Verlag.
- Verran, J. et Whitehead, K. (2005). "Factors affecting microbial adhesion to stainless steel and other materials used in medical devices." *International Journal of Artificial Organs* **28**: 1138-1145.
- Voet, D. et Voet, J. G. (2004). Biochemistry, De Boeck.
- Voinova, M. V., Rodahl, M., Jonson, M. et Kasemo, B. (1999). "Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach." *Physica Scripta* **59**: 391-396.
- Volodkin, D. V., Madaboosi, N., Blacklock, J., Skirtach, A. G. et Mohwald, H. (2009). "Surface-Supported Multilayers Decorated with Bio-active Material Aimed at Light-Triggered Drug Delivery." *Langmuir* **25**: 14037-14043.
- von Klitzing, R. (2006). "Internal structure of polyelectrolyte multilayer assemblies." *Physical Chemistry Chemical Physics* **8**: 5012-5033.
- Voytik-Harbin, S. L., Brightman, A. O., Waisner, B., Lamar, C. H. et Badylak, S. F. (1998). "Application and evaluation of the alamarBlue assay for cell growth and survival of fibroblasts." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **34**: 239-246.
- Wall, S. T., Saha, K., Ashton, R. S., Kam, K. R., Schaffer, D. V. et Healy, K. E. (2008). "Multivalency of Sonic hedgehog conjugated to linear polymer chains modulates protein potency." *Bioconjugate Chemistry* **19**: 806-812.
- Wang, L., Wang, Z., Zhang, X. et Shen, J. (1997). "A new approach for the fabrication of an alternating multilayer film of poly(4-vinylpyridine) and poly(acrylic acid) based on hydrogen bonding." *Macromol. Rapid Commun.* **18**: 509-514.
- Winterton, L. (2002). Method of modifying surface characteristics. Novartis, Novartis. **Patent US N° 6 451 871 B1**.
- Winterton, L., Vogt, J., Lally, J. et Stockinger, F. (1999a). Novartis. **World Patent WO 9935520**.
- Winterton, L., Vogt, J., Lally, J. et Stockinger, F. (1999b). Novartis. **Patent WO 9935520**.
- Wood, K. C., Boedicker, J. Q., Lynn, D. M. et Hammond, P. T. (2005). "Tunable drug release from hydrolytically degradable layer-by-layer thin films." *Langmuir* **21**: 1603-1609.
- Yin, L., Ding, J., He, C., Cui, L., Tang, C. et Yin, C. (2009). "Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery." *Biomaterials* **30**: 5691-5700.
- Yoo, D., Shiratori, S. S. et Rubner, M. F. (1998). "Controlling Bilayer Composition and Surface Wettability of Sequentially Adsorbed Multilayers of Weak Polyelectrolytes." *Macromolecules* **31**: 4309-4318.
- Zilberman, M. et Eberhart, R. C. (2006). Drug-eluting bioresorbable stents for various applications. Annual Review of Biomedical Engineering. **8**: 153-180.

---

## Annexes

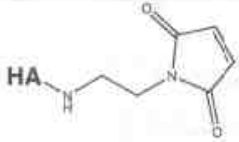
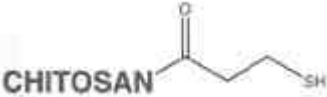
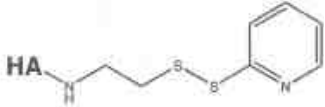
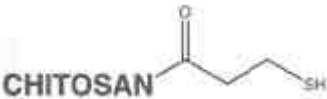

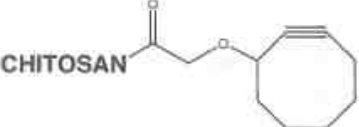
Ces annexes présentent différentes idées de projets dont la faisabilité a été testée durant cette thèse. Il ne s'agit pas d'étude approfondie, mais uniquement de manipulations préliminaires. Les deux sujets consistent à réaliser d'une part des films réticulés à chaque étape et d'autre part à construire des films organique/inorganique par pulvérisation pour de la reconstruction osseuse.

### *1. Films de polysaccharides réticulés à chaque étape*

Le but de ce sujet a été de rigidifier les films de polysaccharides pour permettre une meilleure adhésion des cellules. Pour cela les polysaccharides ont été modifiés par l'équipe de Benoît Frisch de l'UMR 7790 pour permettre leur réticulation à chaque étape de construction du film.

Les polysaccharides utilisés sont le chitosane de faible poids moléculaire et l'acide hyaluronique à 200 000 Da (Sigma-Aldrich) modifiés à 5% sous différentes formes. Le Tableau 6 résume les couples utilisés et la spécificité de la réaction de couplage.

Tableau 6 : Couples de polysaccharides modifiés permettant la construction de film réticulés à chaque étape et spécificité du couplage

Acide hyaluronique modifié	Chitosane modifié	Spécificité du couplage
HA-Maléimide (HA-Mal) 	CHI-SH 	Réaction à pH > 7,4
HA-Thiophène (HA-Thio) 	CHI-SH 	Non sensible au pH, thiopyridone libéré lors de la réaction
HA-PEG <sub>12</sub> -N <sub>3</sub> (HA-N <sub>3</sub> ) 	CHI-Alcyne (CHI-Alcyn) 	Non sensible au pH, pas de catalyseur Cu(I)

Un film CHI/HA sans modification est également construit pour permettre d'effectuer une comparaison. Toutes les solutions sont préparées à une concentration de 0,2 mg/mL dans de l'eau Milli-Q®, 0,15 M NaCl pour les solutions de HA et HCl  $2 \cdot 10^{-3}$  M, 0,15 M NaCl pour les solutions de CHI. Dans le cas de CHI-SH, la solution est fraîchement préparée dans une solution préalablement dégazée pour éviter la formation de ponts disulfure grâce au dioxygène dissout. Tous les pH sont ajustés à 5,5.

La croissance des films a été suivie par QCM. Le temps de contact pour chaque solution ainsi que pour le rinçage avec 0,15 M NaCl est de 5 min. L'opposé de la fréquence normalisée de la troisième harmonique augmente après chaque dépôt de CHI et de HA. La construction des films CHI/HA et CHI-SH/HA-Mal est exponentielle (Figure 47 a). Lors du contact avec une solution de 150 mM NaCl à pH 7,4, CHI/HA diminue en épaisseur en



parallèle les films à base de polysaccharides modifiés restent stables ou gonflent. Il est possible que le pH 5,5 limite la réaction entre le SH et Maléimide ce qui donne une construction linéaire comme avec CHI et HA non fonctionnalisés. Cependant, la réaction semble effective puisque le film reste stable à pH 7,4. Dans le cas des films CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub> et CHI-SH/HA-Thio, la construction est linéaire (Figure 47 b).

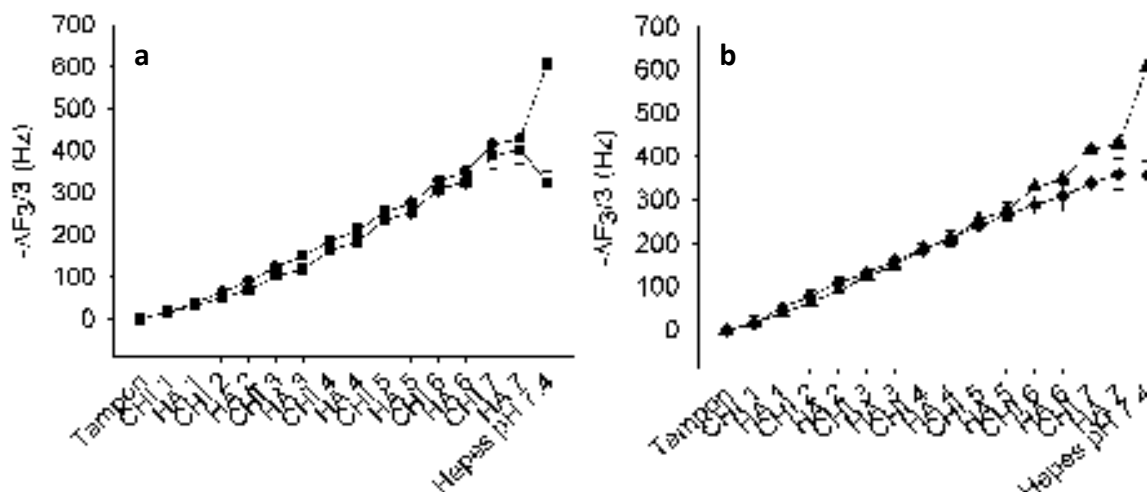


Figure 47 : Evolution de l'opposée de la fréquence normalisée de la troisième harmonique, mesurée par microbalance à cristal de quartz, en fonction de la couche dernière déposée lors de la construction des films de (a) CHI/HA (●) et CHI-SH/HA-Mal (■) et (b) CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub> (▲) et CHI-SH/HA-Thio (◆) à pH 5,5 dans 0,15 M NaCl. La moyenne a été réalisée sur deux expériences.

Lors du contact d'une solution de 4 M NaCl, le film CHI/HA est dissout à 50 % alors que les films à base de polysaccharides modifiés gonflent.

La morphologie de ces films a également été étudiée par AFM en mode contact à sec après contact avec une solution à 150 mM NaCl à pH 7,4 (Figure 48). Les films CHI-SH/HA-Mal et CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub> recouvrent totalement le substrat. Ils ont respectivement une épaisseur de 11 et 6 nm pour une rugosité de 4 et 5 nm. Les films CHI/HA et CHI-SH/HA-Thio ne recouvrent pas toute la surface du substrat. Ils ont une rugosité de 6 nm pour CHI/HA et 5 nm pour CHI-SH/HA-Thio.

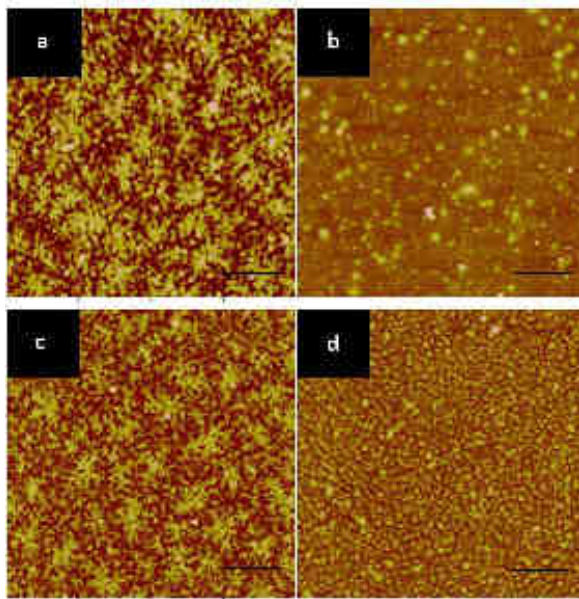


Figure 48 : Morphologie obtenue par microscopie à force atomique des films construits par QCM à pH 5,5 dans 0,15 M NaCl de (a) CHI/HA, (b) CHI-SH/HA-Mal, (c) CHI-Alcyn/HA-N<sub>3</sub> et (d) CHI-SH/HA-Thio. L'échelle (x, y) représente 2  $\mu\text{m}$ , celle en z (a) 30 nm et (b, c et d) 50 nm.

## 2. Pulvérisation d'un système organique/inorganique

Le but de ces expériences préliminaires a été de construire des films à base d'un couple organique/inorganique par pulvérisation alternée et simultanée.

Pour cela nous avons utilisé un couple organique de polysaccharides, CHI et CS solubilisés à 0,3 mg/mL ainsi qu'un couple inorganique de sels de nitrate de calcium tétrahydrate ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{H}_2\text{O}$ ) et de phosphate de sodium dibasique dihydrate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ) à une concentration de 0,32 M pour  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$  et de 0,19 M pour  $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ , proche de la limite de solubilité. Le sel de calcium est solubilisé dans la solution de chitosane et le pH ajusté à 4 tandis que le phosphate de sodium est solubilisé dans celle de chondroïtine sulfate à pH 10. Ces solutions sont pulvérisées alternativement ou simultanément à l'aide du pulvérisateur automatique décrit précédemment sur un wafer de silicium suivant les séquences décrites dans le Matériels et Méthodes sans étape de rinçage. L'épaisseur du film obtenu a été suivie par ellipsométrie après séchage à l'air de l'échantillon

(Figure 49). Un dépôt blanchâtre apparaît sur le substrat, dont l'épaisseur augmente quelque soit le type de pulvérisation. Cette augmentation est plus rapide dans le cas d'une pulvérisation simultanée.

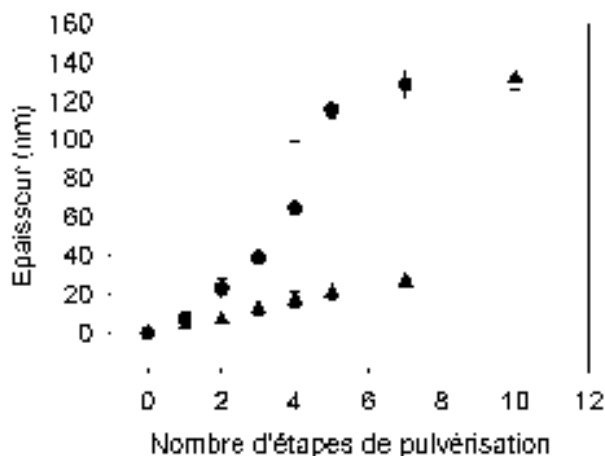


Figure 49 : Evolution de l'épaisseur mesurée par ellipsométrie des films CHI/CS/CAHPO<sub>4</sub> construits par pulvérisation alternée (▲) et simultanée (●) en fonction du nombre d'étapes de pulvérisation.

La microscopie à force atomique se révélant inefficace pour imager ces films, des images de microscopie électronique à balayage ont été effectuées pour avoir une idée de leur morphologie (Figure 50). Le dépôt n'est pas homogène sur toute la surface et est constitué d'un tapis de « fleurs » de plusieurs dizaines de microns, composées de feuillets de quelques microns d'épaisseur. Ces « fleurs » sont composées selon l'analyse EDX d'un rapport Ca/P variant de 1,17 à 1,88. Les différentes phase des cristaux de phosphate de calcium sont : la brushite ou monétite (Ca/P = 1), phosphate octocalcique (Ca/P = 1,33) ou l'hydroxyapatite (Ca/P = 1,66). Les zones les plus proches des « fleurs » contiennent un rapport Ca/P de 1,17 ce qui est proche de la brushite.

Au vu des disparités des valeurs des rapport Ca/P, nous ne pouvons pas conclure avec certitude sur la phase obtenue lors de la construction.

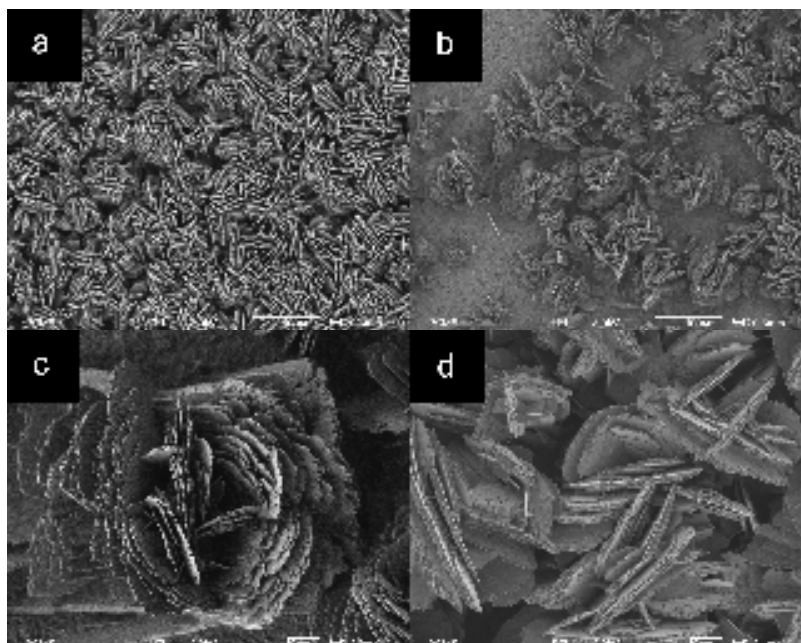


Figure 50 : Images de microscopie électronique à balayage à 3 kV d'un film CHI/CS/CAHPO<sub>4</sub> de 70 étapes de pulvérisation simultanée. La barre d'échelle représente 100 μm (a) et 10 μm (b, c, et d)

## Résumé

### Etude physico-chimique, fonctionnalisation et applications de films de polysaccharides.

En France, 5 % des patients hospitalisés contractent une infection nosocomiale (Institut de veille sanitaire *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France, juin 2006*). Ceci constitue un des problèmes de santé publique majeur. Dans le but de les utiliser en tant que revêtements pour les implants biomédicaux, nous avons développé un nouveau type de films biocompatibles à base de polysaccharides construit par pulvérisation alternée ou simultanée. Ces procédés de pulvérisation, issus du dépôt couche-par-couche de polyanions et de polycations, permettent un gain de temps conséquent par rapport au précédent mode de construction par trempage. Ces revêtements peuvent être fonctionnalisés afin de leur conférer des propriétés biologiques. Nous nous sommes penchés sur trois axes majeurs :

**(a)** Nous nous sommes intéressés à la complexation du couple chitosane/acide hyaluronique en particulier l'influence de différents paramètres lors de la préparation de ces complexes sur leur taille et leur stabilité. Nous avons abordé le dépôt de multicouches sur les complexes afin de développer un nouveau type de particule pour la libération de médicaments.

**(b)** Dans un deuxième temps, nous avons étudié la construction de films de trois couples de polysaccharides par pulvérisation alternée et simultanée. Une corrélation entre la complexation des polysaccharides en solution et la construction des films à base des mêmes polysaccharides par pulvérisation simultanée a été mise en évidence. La biocompatibilité de ces films vis-à-vis de cellules fibroblastes humains a été étudiée pour valider leur utilisation en tant que revêtements de biomatériaux.

**(c)** Le troisième volet de ce travail a abordé la fonctionnalisation de films de polysaccharides par greffage d'un peptide antibactérien et antifongique. L'activité de ces revêtements a été étudiée vis-à-vis de différents pathogènes (deux bactéries et une levure) et leur biocompatibilité testée vis-à-vis des fibroblastes. Ce type de films antibactériens et antifongiques peut être déposé sur les cathéters afin de limiter les infections microbiologiques.

Cette étude démontre qu'il est non seulement possible de construire par pulvérisation alternée et simultanée des films de polysaccharides mais également de rendre ces films actifs par fonctionnalisation grâce au greffage de peptide antimicrobiens.

**Mots Clés :** pulvérisation alternée et simultanée, polysaccharides, complexes, films, revêtements, antibactérien, antifongique, peptides.

---

### Physico-chemical study, functionalization and applications of polysaccharide films.

In France, 5 % of the hospitalized patients develop a hospital-acquired infection (Institut de veille sanitaire *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France, juin 2006*) which constitutes one of the main public health issues. To use them as coatings for biomedical devices, we developed a new kind of biocompatible films based on polysaccharides built by alternate or simultaneous spraying process. These processes, derived from layer-by-layer dipping of polyanions and polycations, let to spare time. These coatings can be functionalized for biomedical applications. With these considerations, we focus on three main axes:

**(a)** First, we focused on the complexation of Chitosane and hyaluronic acid. We investigated the influence of different parameters during the preparation of these complexes on their size and their stability in order to deposit multilayers on this type of complexes for future drug delivery.

**(b)** Next, we studied the buildup of polysaccharide films by alternate and simultaneous spray. We established a correlation between complexes in solution and films of the same polysaccharides. Biocompatibility of obtained polysaccharide films was tested with fibroblasts to validate their use as biomaterial coatings.

**(c)** Finally, we investigated the functionalization of polysaccharide films by grafting an antibacterial and antifungal peptide to hyaluronic acid. Their activity was studied against two bacteria and one yeast and their biocompatibility tested with fibroblasts. These films can be used to functionalize catheters in order to limit bacterial infections.

This study shows not only that it is possible to build polysaccharide films by spraying methods but also to render these films active against different pathogens by functionalization by grafting antimicrobial peptides.

**Keywords:** alternated and simultaneous spraying, polysaccharides, complexes, films, coatings, antibacterial, antifungal, peptides.



Gwenaëlle CADO



# Etude physico-chimique, fonctionnalisation et applications de films de polysaccharides

## Résumé

En France, 5 % des patients hospitalisés contractent une infection nosocomiale. Pour lutter contre ce problème, nous avons développé un nouveau type de films biocompatibles, pouvant être fonctionnalisés, à base de polysaccharides construit par pulvérisation alternée ou simultanée pour les utiliser comme revêtements d'implants biomédicaux. La pulvérisation, issue du dépôt couche-par-couche de polyanions et de polycations, permettent un gain de temps conséquent.

D'abord, la complexation du couple chitosane/acide hyaluronique et le dépôt de multicouches sur ces complexes ont été étudiés. Puis, nous avons étudié la construction de films de 3 couples de polysaccharides par pulvérisation alternée et simultanée. La biocompatibilité de ces films a été étudiée pour valider leur utilisation en tant que revêtements de biomatériaux. Enfin, leur fonctionnalisation a été abordée. L'activité de ces revêtements contre différents pathogènes et leur biocompatibilité ont été testées.

Cette étude montre qu'il est possible de construire par pulvérisation des films de polysaccharides et de les rendre actifs grâce au greffage de peptides antimicrobiens.

**Mots Clés :** pulvérisation alternée et simultanée, polysaccharides, complexes, films, revêtements, antibactérien, antifongique, peptides.

## Résumé en anglais

In France, 5 % of the hospitalized patients develop a hospital-acquired infection. To fight this problem, we developed a new kind of biocompatible films based on polysaccharides, which can be functionalized, built by spraying process. Derived from layer-by-layer dipping of polyanions and polycations, spraying let to spare time.

First, we focused on the complexation of Chitosane and hyaluronic acid. We investigated the complexation and multilayers coating on this type of complexes. Next, we studied the buildup of polysaccharide films by alternate and simultaneous spray. Biocompatibility of the polysaccharide films was tested to validate their use as biomaterial coatings. Eventually, we investigated their functionalization. Their activity against different pathogens and their biocompatibility were tested.

This study shows that it is possible to build polysaccharide films by spraying methods and to render these films active against different pathogens by grafting antimicrobial peptides.

**Keywords:** alternated and simultaneous spraying, polysaccharides, complexes, films, coatings, antibacterial, antifungal, peptides.